

*Vorrei poter cangiar vita con vita,  
dargli tutto il vigor degli anni miei.  
Vorrei veder me vecchia e loro,  
dal sacrificio mio ringiovaniti!*

A MIA MADRE E MIO PADRE

# UNIVERSITÀ DI PISA



## Dipartimento di Farmacia

*Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia  
Farmaceutiche*

Tesi di Laurea:

### **PROGETTAZIONE E SINTESI DI NUOVI DERIVATI ATTIVI VERSO L'ENZIMA SERINA-PALMITOILTRANSFERASI DI TIPO UMANO E BATTERICO**

Relatori:

**Dott. Giuseppe Saccomanni**  
**Prof.ssa Clementina Manera**

Candidato:

**Filippa Lo Biundo**  
N° matricola 455769

ANNO ACCADEMICO 2013/2014  
SSD: CHIM08

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE GENERALE.....</b>	<b>4</b>
1    Introduzione.....	5
1.1    Sfingolipidi.....	5
1.2    Ceramidi.....	6
2    Serina palmitoiltransferasi (SPT).....	7
2.1    SPT batterico.....	9
2.2    SPT eucariotico.....	10
2.3    Specificità di substrato di SPT' .....	12
3    Meccanismo di reazione.....	13
4    Inibitori.....	16
4.1    Penicillamina.....	18
4.2    Cicloserina.....	20
4.3    Miriocina.....	25
5    Retinite Pigmentosa.....	33
6    Alzheimer.....	35
7    Neuropatia Ereditaria Sensitiva ed autosomica di tipo 1 (HSAN 1).....	39
8    Insulino Resistenza.....	43
<b>INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>46</b>
<b>STRUMENTI.....</b>	<b>57</b>

<b>PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>83</b>

# **INTRODUZIONE**

## **GENERALE**

## 1 INTRODUZIONE

Alla fine del XIX secolo, Ludwig Wilhelm Thudichum, identificò per la prima volta la sfingosina (SF), un amminoalcol insaturo, nel suo trattato sulla costituzione chimica del cervello. Fu chiamata così per il mistero e gli enigmi che riguardavano la sua funzione biologica quando venne scoperta e quindi associata al mito della Sfinge<sup>1</sup>.

Successivamente nel 1947 Herbert Carter ne descrisse la struttura e propose il nome dei lipidi derivati dalla sfingosina come sfingolipidi<sup>2</sup>.

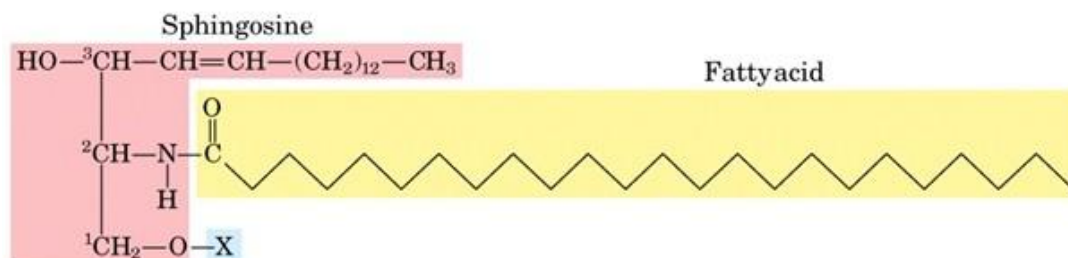
Nel corso degli ultimi decenni, i ricercatori, grazie a studi conformazionali e di distribuzione, hanno scoperto che gli sfingolipidi non hanno solamente un ruolo strutturale all'interno delle cellule, ma sono stati riconosciuti come messaggeri bioattivi. Questi infatti partecipano ad un processo di segnalazione intra ed extra cellulare, sono in grado di creare dei micro domini detti "rafts" nelle membrane, hanno la funzione di barriera della pelle e modulano eventi cellulari come la proliferazione, differenziazione e apoptosi<sup>3</sup>.

Oggigiorno una delle sfide più importanti è quella di aumentare l'attenzione e la ricerca verso gli sfingolipidi e il loro ruolo come potenziali targets di strategie farmaceutiche.

### 1.1 SFINGOLIPIDI

Gli sfingolipidi (SL) sono una delle otto categorie di lipidi del sistema di classificazione LIPID MAPS, sono costituiti da uno scheletro idrocarbonioso di base, formato da una lunga catena sfingoide di 18-20 atomi di carbonio, la più comune è la 4-trans-sfinghenina (1,3-diidrossi-2-ammino alcano), legata ad una molecola di acido grasso di lunghezza variabile per mezzo di un gruppo ammidico (Fig. 1). Gli sfingolipidi si distinguono in base al tipo di scheletro carbonioso dell'acido grasso legato al C-2 ed in base al diverso gruppo della testa polare che può essere: la fosfocolina nella sfingomieline (SM) e una o più unità glucidiche rispettivamente nei cerebrosidi e nei glicosfingolipidi o catene di carboidrati lineari o ramificati nei gangliosidi.

Negli eucarioti gli sfingolipidi sono componenti essenziali di tutte le membrane (sfingomielina, rappresenta il 5-10% dei fosfolipidi di membrana dei mammiferi), la catena carboniosa è formata da diciotto carboni; C-2 e C-3 sono chirali e la configurazione è 2S, 3R, D-Eritro.



**Fig. 1:** struttura base degli sfingolipidi, in viola la sfingosina, un amminoalcol a 18 atomi di C con un doppio legame trans, in giallo un acido grasso a catena lunga e con X è indicata la testa polare (Biotechbook).

SL sono prodotti anche da piante, funghi e alcuni batteri, ma le vie biosintetiche possono differire. Nei mammiferi la principale base sfingoide sembra essere la sfingosina, seguita da diidrossisfingosina, mentre nei funghi e nelle piante si trova la fitosfingosina, che è stata ritrovata in grande quantità anche nei tessuti di mammiferi, come stomaco e rene. La via biosintetica può variare anche tra le specie, infatti, il lievito *Saccharomyces cerevisiae* produce esclusivamente complessi di sfingolipidi contenenti fosfoinositolo nella testa polare, mentre *Pichia pastoris* produce sfingolipidi sia con fosfoinositolo che con glucosilceramidi<sup>1,4</sup>.

## 1.2 CERAMIDI

Diversi studi eseguiti da Braun<sup>5</sup> e Stoffel<sup>6</sup>, indipendentemente, hanno dimostrato nel 1968 che il secondo step della sintesi degli sfingolipidi consiste in una riduzione NADPH-dipendente del gruppo carbonilico sul C-3 ed è seguita dall'acilazione del gruppo amminico con un acido grasso, formando Diidroceramide. Successivamente un'ossidazione della catena alchilica, porta a composti definiti ceramidi<sup>7</sup>. La base sfing-

goide può essere sfingosina, fitosfingosina, 6-idrossisfingosina o sfinganina. Hanno una lunghezza della catena di 16-26 atomi di carbonio. L'acido grasso può essere non idrossilato (14-30 atomi di carbonio),  $\alpha$ -idrossilato (16-28 atomi di carbonio) o  $\omega$ -idrossilato (24-36 atomi di carbonio).

La catena può contenere un numero di atomi di carbonio pari o dispari e possono essere polinsaturi. Nei funghi, la catena acilica è rappresentata principalmente dall'acido grasso C-26 idrossilato, mentre la ceramide nei mammiferi è costituita da catene sature di acido grasso C-16/24<sup>8</sup>.

Le cellule producono sfingolipidi attraverso due diverse vie metaboliche: via catabolica e anabolica. Il catabolismo comporta idrolisi di molecole complesse, come la sfingomieliina e gli glucosfingolipidi, per ottenere ceramidi. Il percorso anabolico (chiamato biosintesi *de novo*) costituisce una cascata enzimatica, che porta alla formazione di ceramidi a partire da substrati semplici ed abbondanti come la L-serina e il palmitoil-CoA<sup>1</sup>.

## 2 SERINA PALMITOILTRANSFERASI

Serina palmitoiltransferasi (SPT) è l'enzima che catalizza il primo e limitante passaggio della via biosintetica degli sfingolipidi in tutti gli organismi studiati.

La biosintesi degli sfingolipidi è diversa tra le specie (ad esempio *S. cerevisiae* produce sfingolipidi con fosfoinositolo nella porzione polare, mentre *P. pastoris* sintetizza sfingolipidi con glucosilceramide e fosfoinositolo), ma il primo step della sintesi *de novo* è conservato in tutte le specie<sup>2</sup>. Il passaggio comune consiste in una condensazione enzimatica svolta dall'enzima serina palmitoiltransferasi, un piridossal-5'-fosfato (PLP) enzima dipendente (Fig. 2). SPT appartiene alla piccola famiglia di enzimi chiamati  $\alpha$ -oxoammine sintasi (AOS), che catalizzano la condensazione di amminoacidi specifici e substrati come acil-CoA, famiglia PLP-dipendente. Altri enzimi appartenenti alla stessa famiglia sono: 8-ammino-7-oxononanoato sintasi (AONs) della via biosintetica della biotina, 5-aminolevulinico sintetasi (ALAS) che catalizza il primo passo per la sintesi del tetrapirrolo e 2-amino-3-ketobutirrato-CoA ligasi (KBL) coinvolto nel metabolismo della treonina.



SPT catalizza nello specifico, una condensazione di Claisen tra l'amminoacido L-serina e l'acido grasso a lunga catena (C16) palmitoil-CoA, che produce il precursore degli sfingolipidi, 3-chetodihidrosfingosina (3-KDS).

La 3-KDS è rapidamente ridotta a diidrosfingosina in presenza di NADPH.

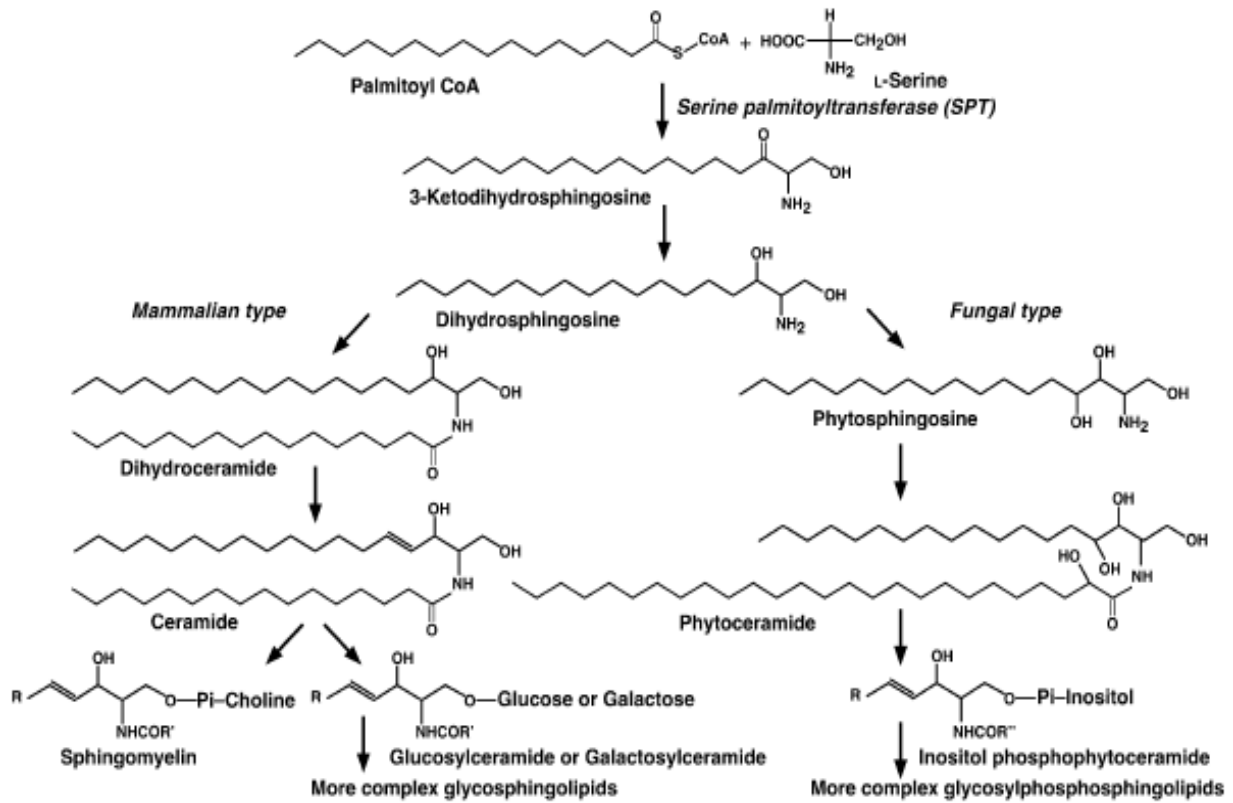


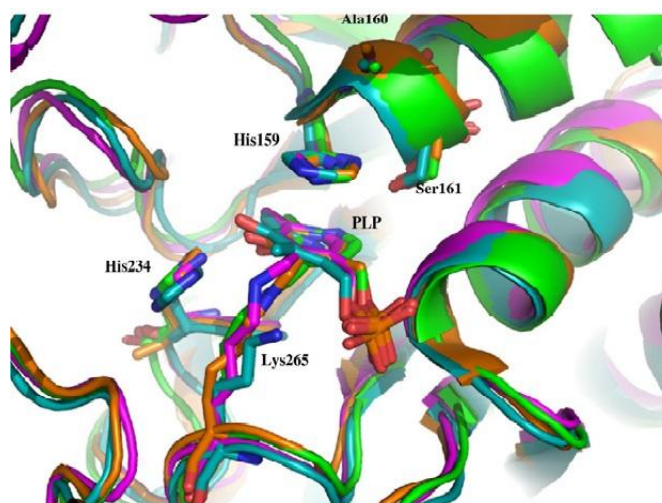
Fig. 2: sintesi dei fosfolipidi in cellule di mammifero e funghi<sup>1</sup>.

La regolazione dello step catalizzato da SPT impedisce l'accumulo dei metaboliti degli sfingolipidi, che costituiscono una classe di molecole bioattive coinvolte, insieme agli enzimi del loro metabolismo, nella trasduzione di diversi tipi di segnale e nella regolazione di alcuni meccanismi cellulari fondamentali, mentre l'inibizione di successivi passaggi biosintetici porta ad un accumulo di metaboliti che sono effettori di morte in diversi modelli sperimentali e condizioni patologiche<sup>1</sup>.

## 2.1 SPT BATTERICO

I batteri aerobici Gram negativi, *Sphingomonas paucimobilis* EY2395<sup>T</sup>, hanno una significativa attività di SPT e a differenza degli enzimi eucarioti, questo enzima si presenta come una proteina omodimerica idrosolubile. L'enzima è stato isolato da Ikushiro *et al.* e questo ne ha permesso lo studio e la clonazione<sup>9</sup>.

È stato possibile ricavare una struttura cristallina dell'enzima SPT e rivela che il monomero della forma olo-SPT è costituito da tre domini: uno N-terminale, uno catalitico centrale e uno C-terminale. Il dominio N-terminale di circa 80 residui comprende un filamento ad  $\alpha$ -elica, seguito da 3  $\beta$ -foglietti, tale dominio è legato al dominio catalitico centrale composto da sette  $\beta$ -foglietti di circa 200 residui, in cui risiede il sito attivo Lys<sup>265</sup>. Il dominio C-terminale è composto da circa 100 residui amminoacidici che interagiscono con quelli del dominio N-terminale<sup>8</sup>. La struttura tridimensionale dell'oloenzima ha rivelato che il cofattore PLP è legato a Lys<sup>265</sup> come aldimina interna (base di Schiff). Tuttavia, per il corretto posizionamento del cofattore PLP, (fondamentale per l'attività catalitica), sono necessarie interazioni  $\pi$  tra l'anello piridinico e l'His<sup>159</sup>. Questo residuo si trova all'inizio di una catena di tre residui (His<sup>159</sup>, Ala<sup>160</sup>, Ser<sup>161</sup>), che è strettamente conservata in tutta la famiglia AOS. PLP interagisce anche con le catene laterali di Asn<sup>138</sup>, Asp<sup>231</sup>, His<sup>234</sup>, Thr<sup>262</sup> e con la regione centrale della Gly<sup>134</sup> e Tyr<sup>135</sup>. Inoltre, è necessario un residuo di Arg<sup>379</sup> per il posizionamento della L-serina nel sito catalitico, a causa dell'interazione cruciale con la porzione carbossilica del substrato<sup>1</sup>.



**Fig. 3:** sovrapposizione dei residui fondamentali ed il cofattore PLP. La struttura di SPT è mostrata in verde<sup>8</sup>.

L'inibizione da elevate concentrazioni di palmitoil-CoA, che è stata osservata per gli enzimi eucariotici, non è stata rilevata in *S. paucimobilis*, così come in *B. melaninogenicus*, inoltre il riconoscimento del substrato in *S. paucimobilis*, soprattutto di acil-CoA non è così rigoroso.

Altri omologhi di SPT, come *Sphingobacterium multivorum* SPT (SmSPT) e *Sphingobacterium wittichii* SPT (SwSPT), presentano differenze su vari livelli. SmSPT ha un allineamento di sequenza del 70% e nel sito attivo dell'aldimina esterna (formato dal PLP e serina) sono presenti due molecole d'acqua legate a due residui amminioacidici, una Ser<sup>81</sup> e una Met<sup>271</sup> e non una Lys<sup>10</sup>. La struttura tridimensionale di SwSPT rivela un sito attivo più grande rispetto a SpSPT, probabilmente a causa dell'uso di un substrato acilato-ACP più ingombrato<sup>4</sup>.

## 2.2 SPT EUCARIOTICO

Negli eucarioti l'enzima SPT è un eterodimero costituito da due subunità, LCB1 e LCB2, entrambe legate al reticolo endoplasmatico (ER) e sono codificate da due geni diversi, *lcb1* (SPTLC1) e *lcb2* (SPTLC2).

Il gene *lcb1* comprende 15 esoni di 85 kbp localizzati nel cromosoma 9, regione q21-q22, mentre il gene *lcb2* comprende 12 esoni di 110 kbp, situati nel cromosoma 14 nella regione q24.3-q31.

Nei mammiferi LCB1 e LCB2 codificano rispettivamente per proteine di 53 e 63 kDa, che hanno il 20% di identità di sequenza e questa somiglianza risulta fondamentale per la formazione di un eterodimero<sup>11,12</sup>.

Entrambi possiedono un solo dominio altamente idrofobico, che rappresenta un dominio di transmembrana (TMD) nella loro regione ammino-terminale, inoltre né LCB1 né LCB2 sembrano essere glicosilate.

Un'analisi indiretta immunocitochimica ha indicato che la regione N-terminale e quella C-terminale di LCB1 sono orientate rispettivamente verso il lume e verso il citosol del reticolo endoplasmatico e che il sito catalitico ha un orientamento citosolico<sup>13,14</sup>.

Il sequenziamento dei geni SPTLC1 e SPTLC2 in *Saccharomyces cerevisiae* ha rivelato che il sito attivo dell'enzima SPT negli eucarioti è localizzato nella subunità LCB2, questa osservazione è stata suggerita dal rilevamento di residui conservati della famiglia di enzimi

AOS (uno di lisina, uno di istidina e due di aspartato), che sono essenziali per bloccare il cofattore PLP nel sito attivo<sup>12</sup>. Appare cruciale per l'attività catalitica dell'enzima SPT la subunità LCB1<sup>1</sup>.

Una mancata espressione o una mutazione missenso nel gene SPTLC1 provoca alterazione dell'attività catalitica di SPT. Inoltre, cellule di CHO difettose nella trascrizione di SPTLC1, esprimono bassi livelli di LCB2. Per ottenere una sovraespressione di LCB2 è richiesta una sovraespressione di LCB1 e LCB2, al contrario un elevato livello di LCB1 non richiede una sovraespressione di LCB2<sup>15</sup>.

LCB1 e LCB2 sono proteine di membrana del ER di tipo I. Un'altra isoforma di LCB2 chiamata LCB3 è espressa solo in alcuni tessuti, come placenta e trofoblasti.

Nel lievito l'enzima SPT è costituito dal cosiddetto "SPOT COMPLEX" che codifica per SPT-ORM1/2-Tsc3-Sac1 (fosfatasi)<sup>4</sup>. Pertanto, LCB1 e LCB2 sono associate ad un terza subunità, Tsc3, che è richiesta per l'attività enzimatica massima di SPT. Questa subunità è un eterodimero in grado di regolare negativamente i geni ORM (ORM1/2). ORM (noto come gene ORMDL negli esseri umani), è una famiglia di geni conservati che comprende ORMDL3, che è stato recentemente identificato come un potenziale fattore di rischio per l'asma infantile<sup>16</sup>.

Recentemente sono state scoperte due ulteriori subunità di SPT nei mammiferi, chiamate ssSPTa e ssSPTb, che possono aumentarne l'attività di circa 10 volte se collegate all'eterodimero LCB1-LCB2.

Il gene ssSPTa, è ubiquitariamente espresso, con più alta espressione nella ghiandola surrenale, nei polmoni, nelle ghiandole salivari, nella prostata, e nella placenta. Al contrario, il gene ssSPTb è stato originariamente descritto come un ADMP (androgeno down-regolatore) nella prostata del topo. Nei topi affetti da ipogonadismo l'espressione è stata limitata alla prostata, mentre in topi normali si è riscontrata una massima espressione in reni e cervello<sup>17</sup>.

## 2.3 SPECIFICITÀ DI SUBSTRATO DI SPT

L'analisi della specificità di substrato dell'enzima purificato SPT<sup>1</sup>, ha indicato che tra le varie acil-CoA, il palmitoil-CoA è il miglior substrato di SPT<sup>1</sup> eucariotico in vitro.

Pentadecanoil- ed eptadecanoil-CoA sono i secondi più efficaci, mentre miristoil-, stearoil-, palmitoleoil-CoA sono substrati molto meno efficienti. Arachidoil-CoA risulta inefficace.

Palmitoil-CoA è uno dei più abbondanti tipi di acil-CoA nelle cellule di mammifero, mentre i livelli di pentadecanoil- e eptadecanoil-CoA sono trascurabili.

Pertanto, palmitoil-CoA è il substrato acil-CoA predominante di SPT in vivo e per questo motivo, la lunghezza della catena delle basi sfingoidi delle cellule di mammifero è principalmente 18<sup>1</sup>.

SPT utilizza rigorosamente L-serina come substrato di amminoacidi.

Né L-alanina, L-serinamide, D, L-serinolo, né L-serina con gruppo metilico hanno agito da competitori nella formazione di [<sup>3</sup>H] KDS da L-[<sup>3</sup>H] serina, sottolineando che tutti i gruppi idrossilici, amminici e carbossilici sono responsabili nel riconoscimento del substrato amminoacidico dell'enzima SPT<sup>18</sup>.

Presumibilmente, l'enzima SPT è in grado di formare la base di Schiff con entrambi gli enantiomeri della serina, mentre lo step successivo ( $\alpha$ -deprotonazione), procede con L-serina, ma non con D-serina. Dal momento che notevoli quantitativi di D-serina sono presenti in diverse aree del cervello, D-serina potrebbe influenzare la sintesi *de novo* degli sfingolipidi in alcuni tipi di cellule arricchite da essa<sup>1</sup>.

### 3 MECCANISMO DI REAZIONE

Il processo catalitico di SPT mostrato in Fig. 4 è un meccanismo multistep, il primo passaggio consiste nella formazione della base di Schiff tra L-serina e PLP (aldimina esterna), dopo di che si ha la rimozione dell' $\alpha$ -idrogeno da PLP-serina e una condensazione di Claisen con il substrato acil-CoA (spesso palmitoil-CoA) per formare un  $\beta$ -chetoacido.

Questo intermedio  $\beta,\gamma$ -insaturo subisce decarbossilazione per formare un prodotto chinonoidale, segue la protonazione di tale prodotto per dare nuovamente l'aldimina esterna ed infine si ha il rilascio di 3-chetosfingalina e rigenerazione dell'aldimina interna. Analisi con enzima purificato suggeriscono che, una molecola di SPT di mammifero è in grado di catalizzare al massimo 80 cicli al minuto<sup>1,14</sup>.

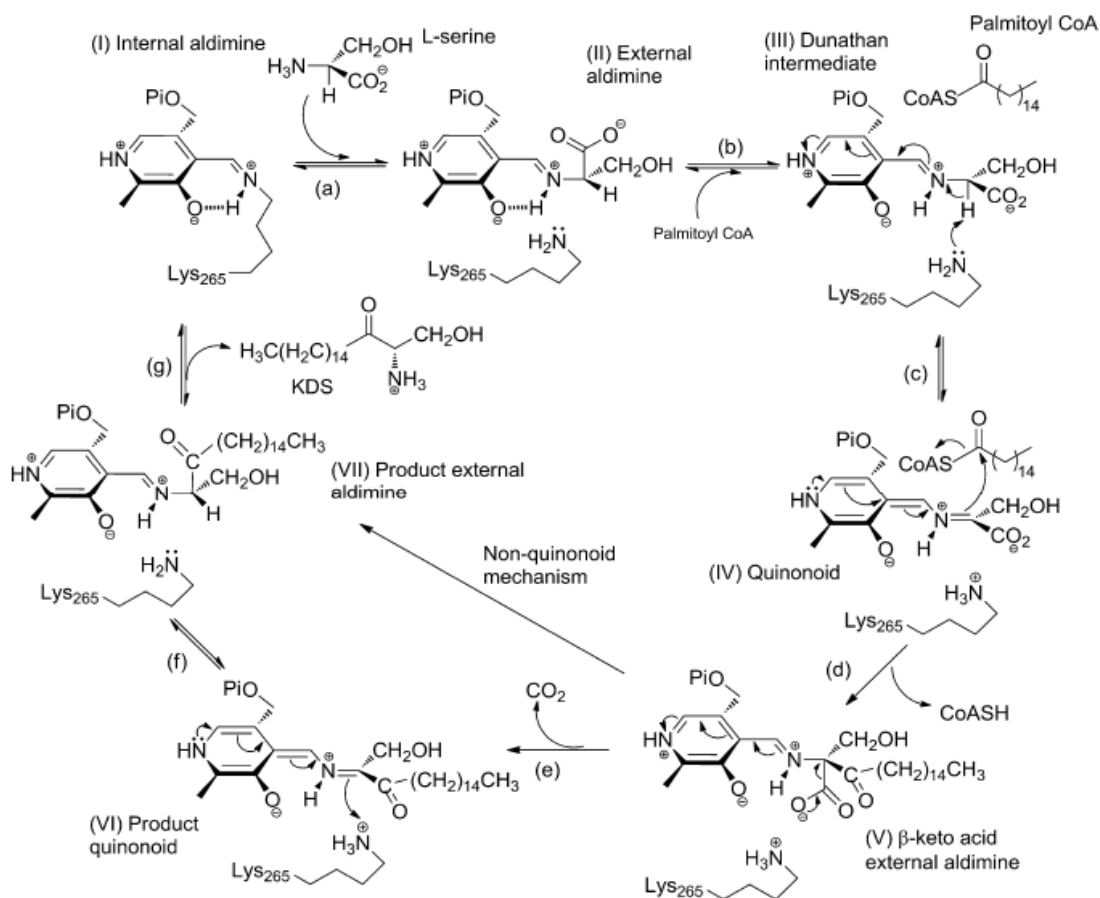
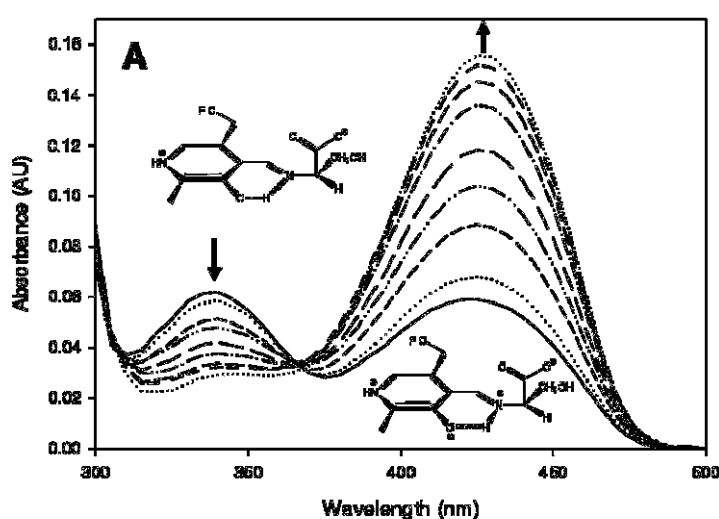


Fig. 4: meccanismo di reazione di SPT<sup>23</sup>.

Il cofattore PLP catalizza tutto il meccanismo di reazione. L'interazione tra il gruppo aldeidico di PLP e la Lys<sup>265</sup>, porta ad una base di Schiff (aldimina interna) nel sito attivo. L'analisi spettrofotometrica di olo-SPT' (Fig. 5) ha rivelato due picchi di assorbimento UV, che rappresentano i due tautomeri della base di Schiff PLP-Lys<sup>265</sup>: l'enolammina (338 nm) e la chetoenammina (426 nm). La struttura cristallina di *S. Multivorum* e *S. Paucimobilis* SPT' ha evidenziato che PLP dà interazioni di Van der Waals con l'His<sup>159</sup> e l'Ala<sup>233</sup>. La formazione di una nuova base di Schiff, tra PLP e L-serina (aldimina esterna), provoca cambiamenti drastici nello spettro UV: si ha un aumento dell'assorbanza a 426 nm e una concomitante diminuzione dell'assorbanza a 338 nm (Fig. 5)<sup>19</sup>.



**Fig. 5:** analisi spettrofotometrica di olo-SPT' e variazione dell'assorbanza durante la reazione con L-serina<sup>19</sup>.

Sono stati individuati due addotti: il primo ha un assorbimento simile a olo-SPT', mentre l'altro presenta un picco massimo a 426 nm (che rappresenta il tautomero chetoenamminico della nuova base di Schiff). L'interazione di PLP con L-serina provoca una rotazione dell'anello piridinico legato C4-C4'.

Una volta formata l'aldimina esterna, la L-serina è stabilizzata da interazioni conformazionali: il suo gruppo carbossilico forma un legame a idrogeno con l'His<sup>159</sup>, mentre il gruppo idrossilico dà interazione sia con il gruppo fosfato del PLP, che con una molecola di acqua.

L'insieme di queste interazioni fissano il complesso PLP-L-serina, consentendo un o-

rientamento perpendicolare ( $80^\circ$ ) del legame C $\alpha$ -COO con il piano immina-piridina. Lo step successivo del meccanismo di reazione è rappresentato dalla formazione di un nuovo legame Carbonio-Carbonio con una condensazione di Claisen. Nella sostituzione nucleofila possono essere coinvolti due intermedi diversi: l'intermedio decarbossilato o quello generato dopo rimozione del  $\alpha$ -H.

Per capire meglio quale intermedio venisse coinvolto nella reazione di sostituzione nucleofila, sono stati condotti alcuni esperimenti con un analogo del palmitoil-CoA, l'S-(2-oxoeptadecil)-CoA. Questo composto presenta un gruppo metilene inserito tra l'atomo di zolfo e i gruppi carbonilici che non consentono la sostituzione nucleofila. I dati ottenuti, eseguendo la reazione enzimatica in presenza di S-(2-oxoeptadecil)-CoA e solvente deuterato, hanno mostrato che la sostituzione del  $\alpha$ -idrogeno con il deuterio, incrementa l'assorbanza di circa 100 volte del picco a 426 nm. Pertanto, l' $\alpha$ -deprotonazione dell'aldimina esterna è favorita in presenza di palmitoil-CoA, con formazione di una quantità significativa dell'addotto chinoide. Una reazione di  $\alpha$ -deprotonazione veloce riduce il rischio di accumulo di prodotti intermedi che possono formare la piridossamina-5'-fosfato (PMP) dopo la reazione di transaminazione (PMP non può essere convertito in PLP, quindi l'enzima viene inattivato).

La struttura ad alta risoluzione di olo-SPT ha fornito una panoramica della relativa sovrapposizione dell'anello planare di PLP con il legame imminico che lo vincola alla Lys<sup>265</sup>. Gli enzimi PLP-dipendenti catalizzano una varietà di reazioni, come proposto da Dunathan in relazione al controllo stereoelettronico della reattività del cofattore.

L'“ipotesi Dunathan” prevede che l'immina e il PLP siano coplanari, per cui il processo di  $\alpha$ -deprotonazione avviene quando il legame coinvolto nella sostituzione nucleofila è perpendicolare al piano immina-piridina. La reazione avviene grazie alla completa sovrapposizione dell'orbitale- $\sigma$  (occupato) del legame designato e l'orbitale- $\pi$  libero del sistema coniugato immina-piridina.

L'incremento del processo di  $\alpha$ -deprotonazione in presenza di palmitoil-CoA è connesso ad un controllo strettamente stereochimico della reazione. Nella conformazione dell'aldimina esterna, il legame C $\alpha$ -H è ruotato di  $40^\circ$  rispetto al piano immina-piridina evitando così il processo  $\alpha$ -deprotonazione.

Questa conformazione è dovuta all'interazione del gruppo carbossilico di L-serina con l'His<sup>159</sup> come si rileva nella struttura cristallina SPT-PLP-serina.

Studi computazionali mostrano che il palmitoil-CoA induce un cambiamento conforma-



zionale legato allo spostamento dell'interazione tra l'idrogeno di L-serina con l'His<sup>159</sup>, infatti il palmitoil-CoA interagisce con l'His<sup>159</sup> attraverso un legame a idrogeno, mentre la L-serina forma una nuova interazione con il gruppo guanidinico dell'Arg<sup>390</sup> ruotando il legame C $\alpha$ -N di 50°. In questa nuova conformazione, il legame C $\alpha$ -H della L-serina risulta perpendicolare al piano immina-piridina, promuovendo l' $\alpha$ -deprotonazione<sup>14</sup>.

La sostituzione nucleofila dell'intermedio chinoide con il gruppo carbossilico del tioestere dell'acil-CoA, porta alla formazione di un derivato  $\beta$ -chetoacidico. L'interazione tra palmitoil-CoA e l'His<sup>159</sup>, porta alla formazione del legame carbonio-carbonio, promosso attraverso una catalisi acida svolta dall'His<sup>159</sup> attraverso lo scambio di un idrogeno con il gruppo carbossilico del palmitoil-CoA, inducendo il giusto posizionamento. Successivamente i derivati  $\beta$ -chetoacidi subiscono decarbossilazione e rilascio dell'addotto finale KDS<sup>1</sup>.

## 4 INIBITORI

Sono stati scoperti differenti inibitori naturali di SPT (Fig. 6), tra cui le Sfingofungine, la Lipoxamicina (neoenactina M1) e la Miriocina (ISP-1/termozimocidina). Tali composti inibiscono l'enzima SPT in preparati cellulari di tipo fungino e di tipo mammifero con valori di IC<sub>50</sub> nell'ordine del nanomolare. Questi inibitori selettivi di SPT, sono strutturalmente simili all'intermedio transitorio che si forma in seguito alla reazione tra L-serina e palmitoil-CoA, suggerendo che una struttura analoga all' "intermedio" sia fondamentale per l'attività inibitoria.

Le Viridiofungine sono potenti inibitori dell'enzima SPT nei mammiferi e inibiscono la sintesi dello squalene con valori di IC<sub>50</sub> nell'ordine del micromolare.

La L-Cicloserina e la  $\beta$ -cloro-L-alanine, sono stati utilizzati a volte per inibire SPT in cellule intatte. Poiché risultano inibitori di una vasta gamma di enzimi PLP-dipendenti, risulta importante una particolare attenzione nel loro utilizzo come farmaci per l'inibizione specifica della sintesi degli sfingolipidi<sup>1</sup>.

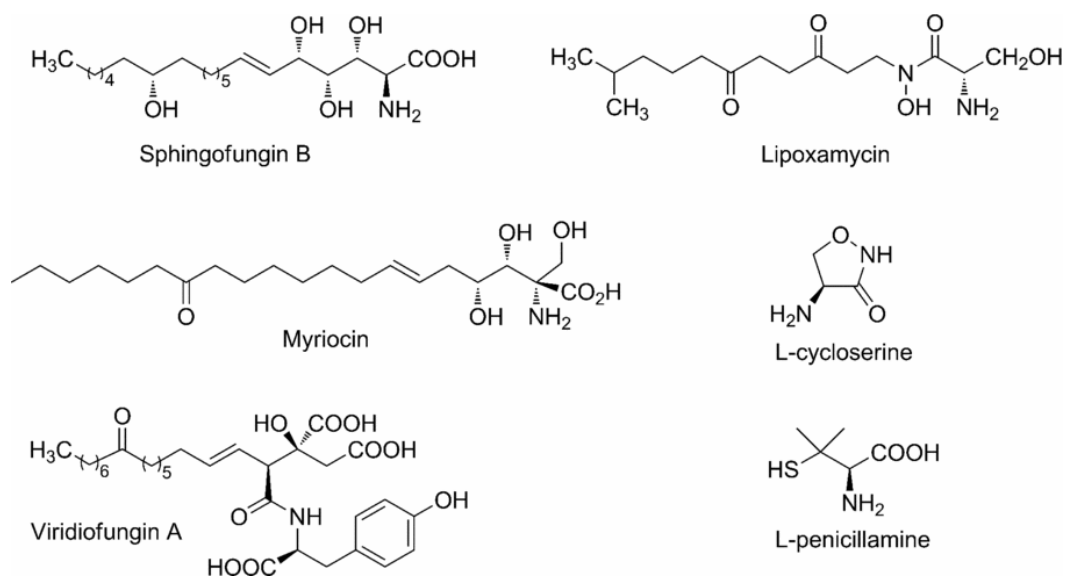


Fig. 6: *inibitori naturali SPT*<sup>8</sup>.

L'attività inibitoria della Sfingofungina B è legata fortemente alla stereochimica, per cui l'ossidril in C14 risulta avere un ruolo fondamentale. D'altra parte, anche la configurazione dei centri stereogenici in posizione  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  del gruppo carbonilico è essenziale per l'attività inibitoria<sup>20</sup>.

Le Viridiofungine, isolate da Harris e collaboratori nel 1993 dal fungo, *Trichoderma viride*, appartengono alla famiglia degli alchil-citrati, queste possiedono attività antifungina ad ampio spettro, con concentrazioni fungicide, nell'intervallo di 1-20  $\mu\text{g/ml}$ . Inoltre, le viridiofungine inibiscono la sintesi dello squalene sia nei ratti che nei lieviti. Questa attività antifungina, non correlata all'inibizione della biosintesi dell'ergosterolo, è frutto di un'attività inibitoria molto potente (range nanomolare) nei confronti dell'enzima serina palmitoiltransferasi<sup>21</sup>.

## 4.1 PENICILLAMINA

La penicillamina (Pen) è un  $\alpha$ -amminoacido prodotto dalla degradazione delle penicilline (idrolisi). L'enantiomero D-Pen viene usato nella malattia di Wilson come chelante del rame per la formazione di disolfuri misti con cisteina. Studi hanno dimostrato che sia i singoli enantiomeri che la miscela racemica, sono dotati di attività inibitoria anti-PLP, verso alcuni enzimi PLP-dipendenti come ad esempio: alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, glutammato decarbossilasi, istidina decarbossilasi e serina idrossimetiltransferasi. L'attività inibitoria della L-Pen è dovuta alla somiglianza strutturale con il substrato enzimatico naturale (L-aminoacidi) (Fig. 7).

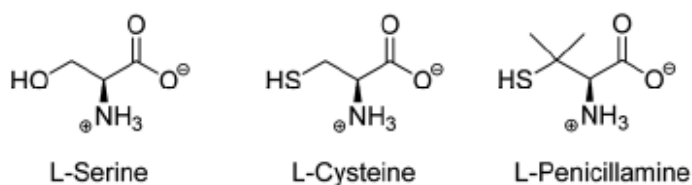
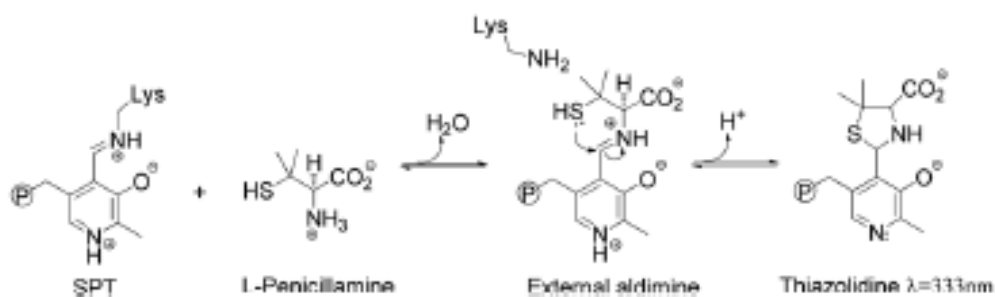


Fig. 7: L-amminoacidi, inibitori SPT.

Una recente ricerca, sviluppata dal gruppo del Professor Campopiano, ha utilizzato la spettroscopia UV-visibile e la spettrometria di massa per studiare la cinetica enzimatica dell'inibizione di SPT ad opera della penicillamina in *Sphingomonas Paucimobilis* (spSPT). L'incubazione di D-Pen e L-Pen con spSPT ha portato un'inibizione enzimatica in percentuali differenti. Infatti incubando L-Pen a concentrazione 5 mM con spSPT, si ottiene una riduzione enzimatica del 3%, mentre con D-Pen del 34%. Tale inibizione è di tipo reversibile, con un meccanismo di inattivazione di SPT ottenuto disattivando il cofattore PLP. Infatti, l'incubazione di SPT inattivato da D-Pen e L-Pen con un tampone contenente 50 mM di PLP, ripristina l'attività dell'enzima rispettivamente del 80% e del 57%. Non è possibile ripristinare l'attività enzimatica del 100% perché avvengono reazioni competitive aggiuntive, che vanno a modificare irreversibilmente le proteine.

Il gruppo tiolo della Penicillamina gioca un ruolo fondamentale nel meccanismo di inibizione, poichè risulta essere più nucleofilo del gruppo ossidrilico della L-Ser ed è in grado di interagire meglio con il gruppo aldeidico di PLP, portando all'addotto PLP:tiazolidina (PLP: TA)(Fig. 8).



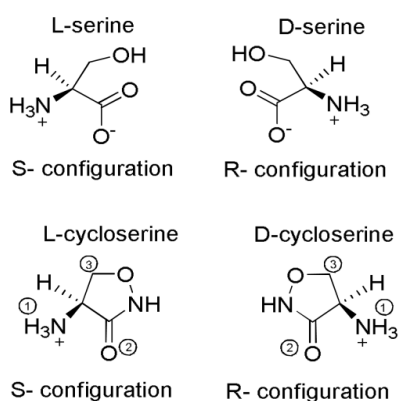
**Fig. 8:** aggiunta di L-Pen all'enzima SPT e formazione dell' addotto PLP:TA tramite un'aldimina esterna<sup>22</sup>.

La reazione di inibizione è stata monitorata osservando la scomparsa del picco attribuito al PLP libero a 390 nm e la comparsa di un nuovo picco a 333 nm attribuito all'addotto tiazolidinico. Questi cambiamenti (scomparsa anche del tautomero chetoenamminico di SPT a 420 nm) sono stati evidenziati tramite approccio spettrofotometrico, dovuto al legame di L-Pen al sistema olo-SPT. I dati ottenuti da studi di spettrometria di massa (ESI-MS) su tali campioni, hanno confermato la formazione di un addotto PLP:TA.

Inoltre sono state confrontate le attività di L-Pen e di L-cisteina, evidenziando un'attività inibitoria più veloce di L-Pen, probabilmente dovuta alla presenza dei due gruppi metilici in  $\alpha$  al gruppo tiolico in grado di rafforzare la formazione del ciclo grazie all'effetto Thorpe-Ingold<sup>22</sup>.

## 4.2 CICLOSERINA

Entrambi gli enantiomeri della cicloserina possono essere considerati analoghi strutturali ciclici della serina o dell'alanina e hanno dimostrato essere inibitori irreversibili di molte transaminasi, racemasi e decarbossilasi PLP-dipendenti (Fig. 9).



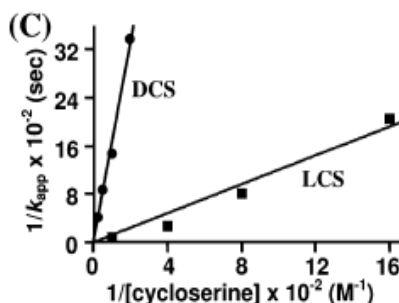
**Fig. 9:** struttura dei substrati e inibitori SPT<sup>23</sup>.

La L-cicloserina (LCS) è un antibiotico ad ampio spettro, ottenuta sinteticamente a partire dalla D-cicloserina (DCS), un prodotto naturale isolato dal ceppo di *Streptomyces*<sup>23</sup>. A causa dei suoi gravi effetti collaterali, la DCS è più comunemente usata in terapia come farmaco di seconda scelta in associazione nel trattamento della tubercolosi. La DCS è utilizzata anche in studi neurologici poiché è un potente agonista dei recettori dell'acido N-metil-D-aspartico (NMDA), coinvolti nei processi di neurotrasmissione. Uno dei suoi principali target antibatterici è l'alanina racemasi PLP-dipendente, un enzima essenziale che genera D-alanina per la formazione del dipeptide D-alanil-D-alanina incorporato nello strato del peptidoglicano batterico. La CS inattiva tali enzimi attraverso la formazione di un addotto stabile con il cofattore essenziale PLP<sup>24</sup>.

Anche se negli studi biochimici la LCS è comunemente usata come regolatore del metabolismo dei lipidi, il suo meccanismo d'azione non è stato del tutto chiarito.

Secondo il metodo di Kitz e Wilson, l'inattivazione risulta essere tempo-dipendente e

come mostrato nel grafico (Fig. 10), si rileva la formazione di complessi deboli ma veloci tra LCS e DCS con SPT.

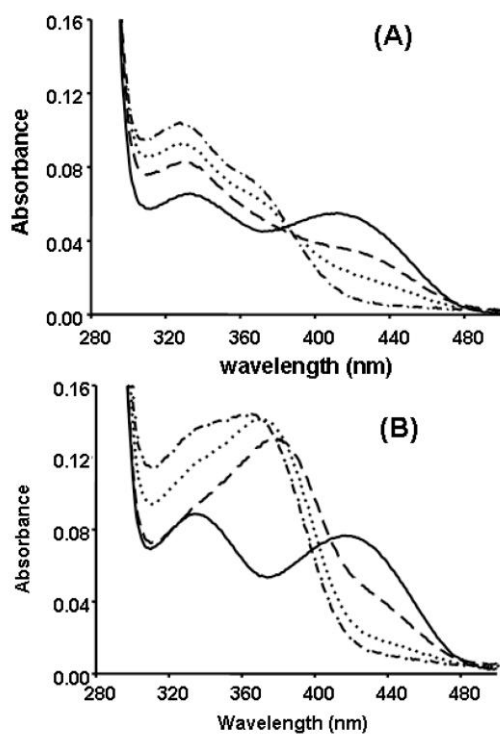


**Fig. 10:** grafico  $1/K_{app}$  rispetto a  $1/[\text{inibitore}]$  per LCS e DCS<sup>23</sup>.

È stato determinato che sono necessarie concentrazioni 15 volte maggiori di DCS rispetto alla LCS, per inattivare nella stessa misura e per un periodo di tempo simile, l'attività di SPT. Tale attività, misurata monitorando la formazione del tiolo libero del CoASH attraverso un dosaggio continuo di DTNB dopo 2 ore di inibizione con 5 mM di LCS e DCS, è stata ridotta rispettivamente all' 1% e al 22%.

L'attività iniziale dell'enzima è stata ripristinata del 79% (DCS) e 83% (LCS) dopo dialisi con un tampone contenente 25  $\mu\text{M}$  di PLP.

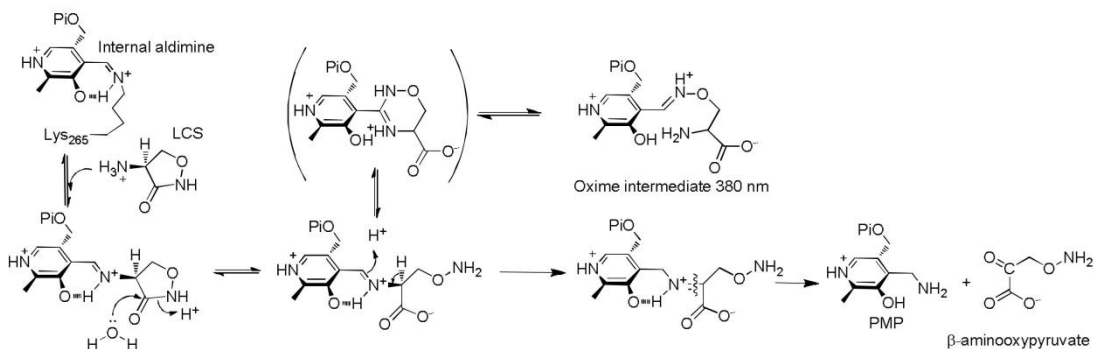
Lo spettro UV-visibile dell'olo-SPT (massimi a 336 nm e 425 nm, Fig. 11A e B linea continua), dopo incubazione con LCS (5mM) a pH 7.5 e 25 °C ha subito notevoli cambiamenti, suggerendo che la LCS interagisce con il cofattore PLP (Fig. 11A, linee tratteggiate). Dopo circa 30 secondi, il picco corrispondente all'addotto chetoenaminico (425 nm) si è ridotto a circa il 10% del suo valore originale con una crescita concomitante di due nuovi picchi a 330 nm e 380 nm. Non sono state osservate ulteriori modifiche nello spettro UV-visibile quando il campione è stato incubato per circa 8 ore, ciò suggerisce che il cofattore PLP si è legato al residuo di Lys<sup>265</sup> formando una o più nuove specie, attraverso la formazione di un'aldimina interna (Fig. 11B).



**Fig. 11:** (A) SPT e 5 mM LCS al tempo 0 (linea continua), 30 secondi (trattino lungo), 1 minuto (linea tratteggiata) (B) SPT e 5 mM DLS al tempo zero (linea continua) 30 secondi (trattino lungo), 2 ore (linea tratteggiata), 10 ore (trattino e punto)<sup>23</sup>.

Per quanto riguarda l'inibizione di SPT ad opera della cicloserina, ad oggi sono stati proposti diversi meccanismi.

Nel caso di SPT di *S. paucimobilis*, Ikushiro *et al.*<sup>19</sup> hanno ipotizzato che l'idrolisi dell'anello, porti alla formazione della piridossammina 5'-fosfato libera (PMP) e  $\beta$ -amminoxipiruvato (Fig. 12).



**Fig. 12:** meccanismo di inattivazione di SPT ad opera di LCS proposto da Ikushiro *et al.*<sup>23</sup>.

Infatti gli stessi autori ipotizzano che il picco a 380 nm osservato dopo incubazione di SPT con LCS potrebbe essere dovuto alla formazione di un intermedio ossimico transitorio, mentre il picco a 330 nm è dovuto all'apertura idrolitica dell'anello. Pertanto sembra che LCS possa interagire con i suoi enzimi bersaglio in modi diversi, con l'anello della cicloserina rimasto intatto oppure sottoposto a scissione.

Osservando gli spettri di assorbimento di olo-SPT è stato rilevato che la DCS inattiva SPT ad una velocità minore rispetto a LCS e per questo motivo ci potrebbero essere, parallelamente alla formazione dei prodotti più lenti, un accumulo di intermedi. Gli spettri UV-visibile di olo-SPT in presenza di LCS e DCS sono molto diversi tra loro, al contrario gli spettri di PLP libero in presenza di entrambi gli enantiomeri risultano essere identici. Quindi è chiaro che l'enzima non si limita ad ospitare l'aldimina PLP-cicloserina che si forma tra il cofattore e l'inibitore in soluzione.

Il nuovo picco che si forma a 330 nm ha un profilo simile a quello rilevato per il PMP libero (320 nm) e quindi si potrebbe ipotizzare come attribuibile al PMP legato.

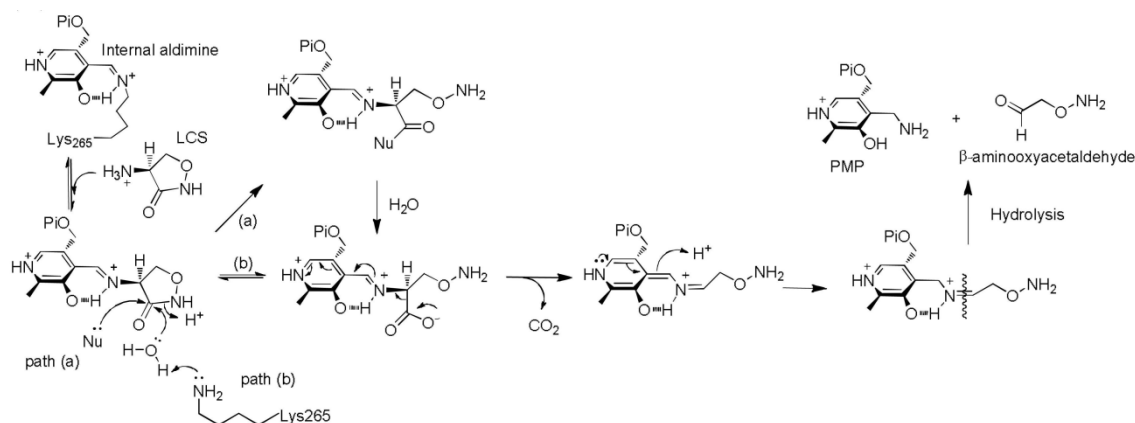
Gli intermedi di reazione, dopo l'inattivazione di SPT, sono stati analizzati mediante studi di LC ESI-MS. L'incubazione con LCS ha dato un picco a 2,8 minuti ( $m/z=248$ ) corrispondente alla PMP e un altro picco a 3,1 minuti ( $m/z=256$ ) corrispondente allo ione  $[M+H]$  dell'addotto idrazinico formato dal processo di derivatizzazione della  $\beta$ -amminossiacetaldeide con 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNP).

Questi picchi non sono stati osservati in esperimenti di controllo con PLP libero e il derivato 2,4-DNP, tali risultati suggeriscono che il meccanismo di inibizione di LCS si basa sull'apertura dell'anello della cicloserina per scissione del legame ammidico, poichè nell'aldimina esterna il protone C- $\alpha$  nell'addotto PLP:cicloserina non si trova nell'orientazione ottimale per essere rimosso dal residuo lisinico.

Nel passaggio successivo possono avvenire due processi: a) acilazione dell'anello aperto (meccanismo mediato dall'enzima) e idrolisi per formare l'intermedio PLP carbossilato (percorso [a]); b) l'anello aperto potrebbe andare incontro a catalisi acida e subire attacco nucleofilo dell'acqua (percorso [b]).

Queste reazioni possono portare alla formazione di un'ossima (picco osservabile a 380 nm nello spettro UV-vis) o di un addotto decarbossilato, seguito da un'idrolisi che conduce a PMP e  $\beta$ -amminoossiacetaldeide (Fig 13).





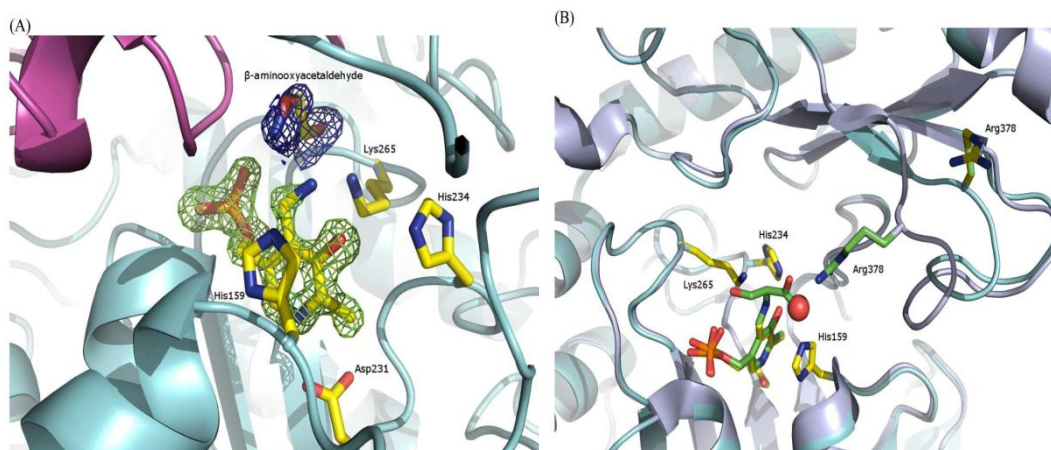
**Fig. 13:** apertura dell'anello, meccanismo di decarbossilazione per l'inattivazione di SPT da parte di LCS. Percorso (a) meccanismo mediato da un enzima, nucleofilo (Nu) - con formazione di un intermedio acilato. Percorso (b) è il meccanismo idrolitico diretto<sup>23</sup>.

Utilizzando SPT R378N (enzima modificato) è stato possibile studiare e isolare l'intermedio chiave che si forma (SPT:L-serina), il mutante risulta essere ancora attivo riducendone la quantità di circa 40 volte rispetto all'enzima non modificato. Tale enzima contiene nel sito attivo un residuo di Arg<sup>378</sup> alterato che forma un ponte salino con il residuo carbossilico dell'aldimina esterna (L-serina).

Quando LCS (5 mM) viene aggiunta all'enzima mutato, è stata osservata una riduzione del picco a 415 nm dopo circa 30 minuti e la comparsa di un nuovo picco a 330 nm con una piccola spalla a 380 nm.

Completata l'inattivazione, è stato notato che il picco a 380 nm risulta notevolmente inferiore rispetto al picco dell'enzima non mutato. Inoltre dopo l'aggiunta dell'inibitore DCS al mutante, è stata più evidente la comparsa transitoria di un nuovo picco a 495 nm, che scompare dopo 30 secondi, probabilmente dovuto alla formazione di una specie chinonoide (formata dalla decarbossilazione). In aggiunta a quanto descritto precedentemente, nello spettro è presente un picco con plateau a 340 nm e uno a 380 nm con una piccola spalla a 425 nm (Fig. 14). Queste ricerche sono state supportate anche attraverso studi di modellazione molecolare sull'addotto PMP isolato<sup>23</sup>.

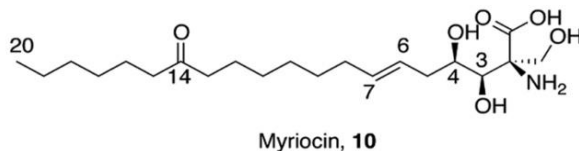
Ulteriori studi, attraverso un modello molecolare sostitutivo che non comprendeva il co-fattore, hanno permesso di calcolare la densità elettronica per la molecola PMP (mappa è sagomata in verde a 3s, 0.2 Å<sup>-3</sup>, Fig. 14).



**Fig. 14:** Il monomero A è mostrato con nastro in azzurro e monomero B in magenta. L'ulteriore Fo-Fc densità elettronica "blob" è mostrata in blu, sagomato a 2.7s (0.2 Å)<sup>23</sup>.

### 4.3 MIRIOCINA

La Miriocina, acido [(2S, 3R, 4R, 6E)-2-ammino-3,4-diidrossi-2-(idrossimetil)-14-ossos-6-eicosenoico] anche nota come termozimocidina ISP-1 (Fig. 15), è un prodotto naturale di origine fungina. Attualmente essendo un potente inibitore dell'enzima SPT è ampiamente utilizzata per bloccare la biosintesi degli SL.



**Fig. 15:** struttura della miriocina<sup>25</sup>.

Scoperta nel 1972 da due gruppi indipendenti nelle muffe termofile di *Myriococcum albomyces* e *Mycelia sterilia*, è stata nuovamente isolata dal fungo *Isaria sinclairii* nel 1994 e risulta essere un potente immunosoppressore. Kawasaki e colleghi hanno determinato un valo-

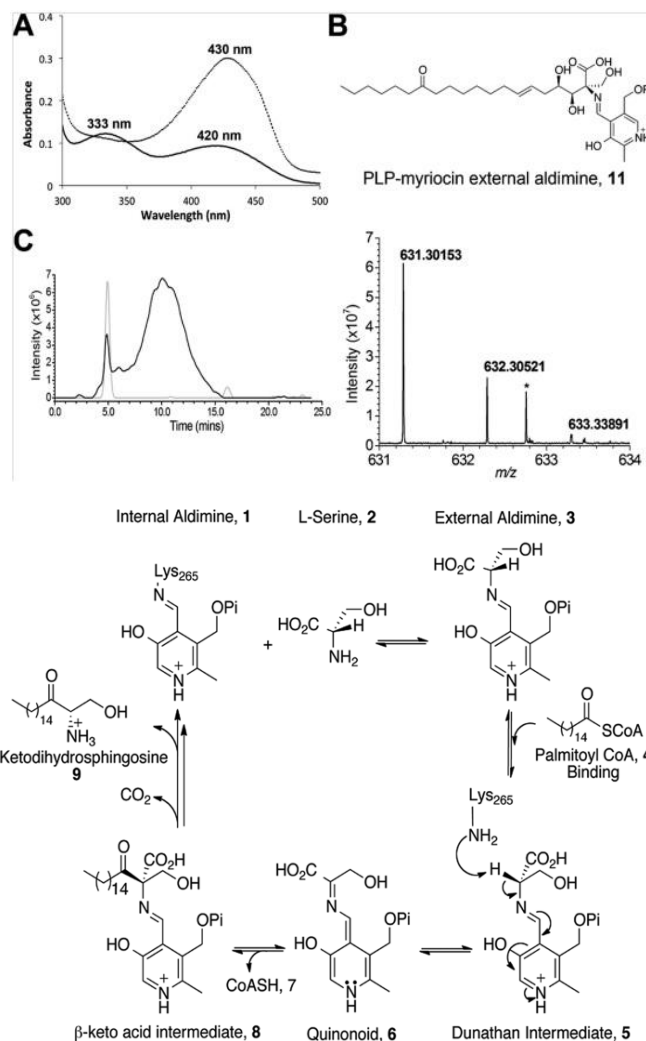
re di IC<sub>50</sub> di 15 nM, utilizzando la linea citotossica di cellule T del topo, CTLL-2 come modello per l'inibizione miriocina-dipendente della crescita cellulare attraverso il blocco della formazione di ceramidi<sup>25</sup>. Da tali studi poiché è stato verificato il blocco della formazione di sfingosina, è stato ipotizzato come obiettivo primario della miriocina, l'enzima SPT.

Nel 1999 Schreiber e colleghi<sup>26</sup> hanno usato la Miriocina come resina di affinità per identificare le due subunità di SPT murine (SPT1 e SPT2 codificate dai geni, lcb1 e lcb2, rispettivamente) in quanto obiettivi primari del prodotto naturale, mentre Breslow *et al*<sup>6</sup> l'hanno utilizzata per l'individuazione di complessi proteici di membrana legate a SPT (SPOT COMPLEX). Inoltre un recente studio ha dimostrato che la Miriocina riduce i livelli di ceramide nel modello murino RD10 di retinite pigmentosa (RP) e quindi il suo utilizzo può salvaguardare i fotorecettori da processi apoptotici<sup>27</sup>. Nonostante il suo utilizzo, le basi molecolari dell'inibizione della Miriocina nei confronti dell'enzima SPT sono in gran parte sconosciute.

Campopiano e collaboratori hanno recentemente messo in luce il meccanismo molecolare di inibizione di SPT della Miriocina utilizzando una forma solubile dell'enzima ricombinante (spSPT) estratto dal ceppo *Sphingomonas paucimobilis*.

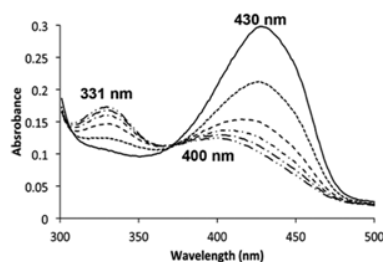
Le analisi UV-vis di olo-SPT dopo l'aggiunta di cinque volte un eccesso molare di Miriocina hanno rivelato dei cambiamenti nei due picchi caratteristici a 333 nm e 420 nm (corrispondenti alle forme: chetoenamina e enolamina dell'aldimina esterna), associato ad un aumento di assorbanza con un massimo a 430 nm e la scomparsa del picco a 333 nm.

Questo dato riflette una reazione di transaminazione tra PLP e Miriocina che porta alla formazione di un'aldimina esterna stabile che mima il  $\beta$ -chetoacido intermedio (Fig.16b) ed è confermata mediante analisi LC ESI-MS (Fig.16).



**Fig. 16:** inibizione di SPT attraverso la formazione di un'aldimina esterna. **(A)** spettro UV-Vis di 40  $\mu$ M SPT prima (linea continua) e dopo 200  $\mu$ M aggiunta di Miriocina (linea tratteggiata). **(B)** La struttura proposta per il complesso inibitorio aldimina PLP-Miriocina. **(C)** Rilevazione dell'aldimina PLP-Miriocina da LC-MS. Top, cromatogramma Ioni Estratti a  $m/z$  631. In basso, alta risoluzione spettro di massa dell'aldimina PLP-miriocina, ottenuto sommando gli spettri tra  $t = 8$ -12 minuti.  $[(M + H)^+ C_{29}H_{48}N_2O_{11}P$ ; predetto  $m/z$  631,29902; osservato errore di 4.0 ppm). \* Denota un contaminante<sup>25</sup>.

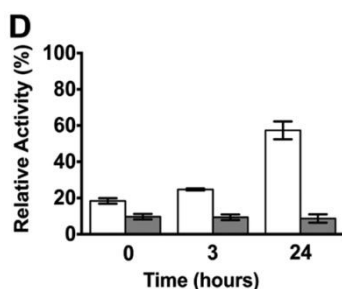
L'aldimina PLP-Miriocina (composto 11 in Figura 16b) è stabile a 25° C per 90 minuti prima dell'inizio di una transizione spettrale lenta che ha luogo nel corso delle 16 ore. Tale transizione comporta un calo del picco a 430 nm e un aumento di quello a 331 nm e 400 nm, indicando una conversione di **11** in un'aldimina PLP modificata che ha potere inibitorio (Fig. 17).



**Fig. 17:** Analisi UV-vis della degradazione dell'aldimina esterna PLP-Miriocina nel wild-type SPT. L'aldimina esterna PLP-Miriocina (linea continua) è stabile per 90 minuti, prima di un calo del picco a 430 nm, che è accompagnato da un concomitante aumento a 331 e 400 nm oltre 16 ore (le linee punteggiate e tratteggiate)<sup>25</sup>.

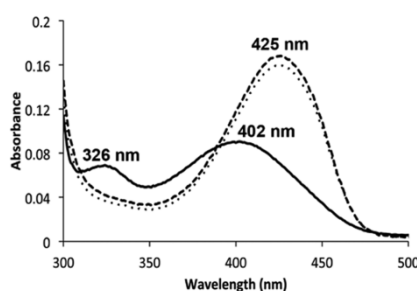
Il complesso SPT:PLP-Miriocina ha una natura non covalente e reversibile, ha un recupero dell'attività molto lento ( $k_{off}$ ) quando incubato con la Miriocina per 10 minuti, mentre il campione dializzato di PLP (25  $\mu$ M in tampone) per 24 ore, consente un ripristino dell'attività enzimatica del 60% rilevato attraverso spettroscopia UV-vis, per la presenza di una nuova aldimina interna. Interazioni irreversibili Miriocina-enzima con struttura di natura covalente, sono state osservate quando i campioni sono stati sottoposti a incubazione per lungo tempo (16 ore).

Gli incrementi lineari dei valori di  $IC_{50}$  ottenuti con diverse concentrazioni di L-serina e palmitoil-CoA, hanno stabilito che la Miriocina è un inibitore competitivo ( $K_i$   $967 \pm 98$  nM) sia per la L-serina che per altri enzimi riduttasi che utilizzano come substrato il palmitoil-CoA (Fig. 18).



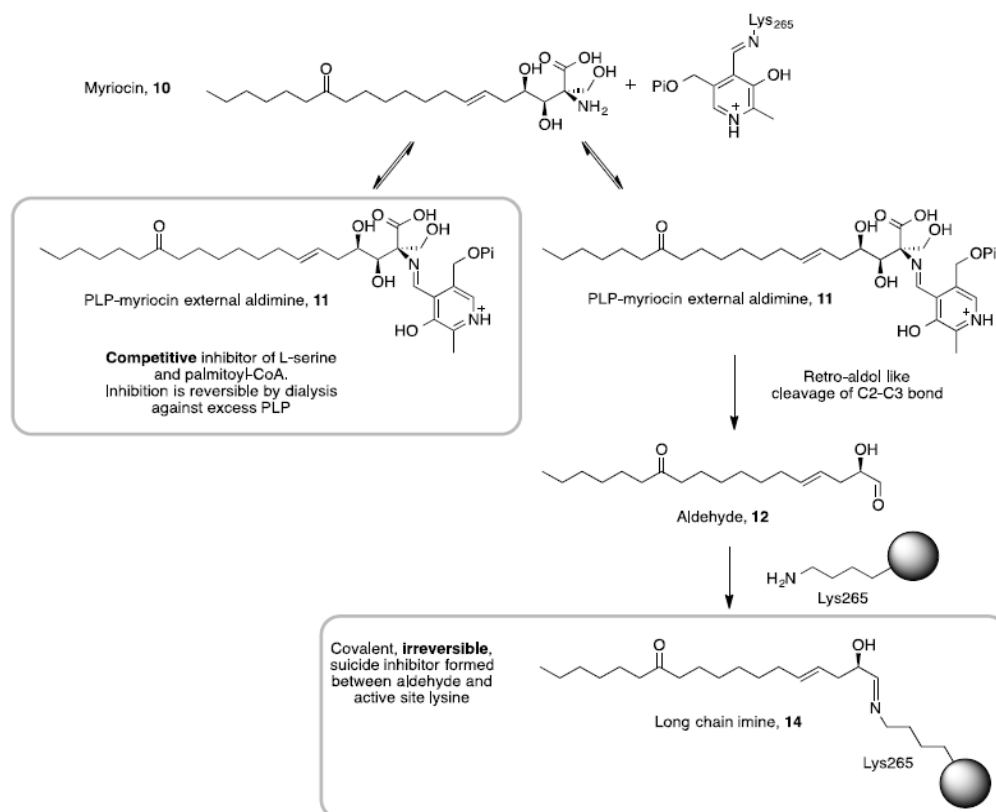
**Fig. 18:** Attività enzimatica relativa dopo la rimozione di specie inibitorie mediante dialisi. SPT è stato inibito con 200  $\mu$ M di Miriocina e incubato per 10 minuti (barre bianche) o 16 ore (barre grigie) a 25 °C prima della rimozione della Miriocina mediante un'ampia dialisi. L'attività enzimatica è stata quindi determinata a 0 ore, 3 ore e 24 ore dopo la dialisi<sup>25</sup>.

Per comprendere meglio il ruolo della Lys<sup>265</sup> nel duplice meccanismo di reazione della Miriocina, è stata eseguita un'incubazione con un eccesso molare di Miriocina cinque volte maggiore e quantità catalitiche dell'enzima SPT inattivo (K265A SPT) che non presenta residui di lisina nel sito attivo. Dopo 16 ore lo spettro UV-vis è rimasto immutato, suggerendo che il complesso inibitorio iniziale SPT:PLP-miriocina si rompe per formare una seconda specie che inibisce anche l'enzima naturale SPT (Fig. 19).

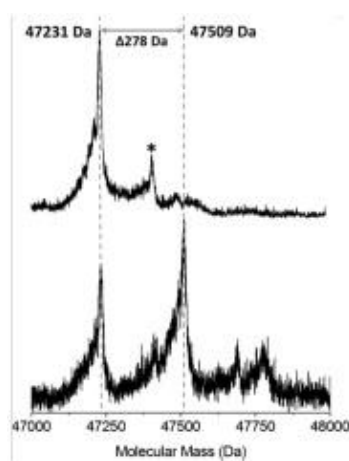


**Fig. 19:** Analisi UV-vis dell'SPT K265A (40  $\mu$ M) ha mostrato due massimi d'assorbanza a 326 e 402 nm (linea continua). Dopo l'aggiunta di 200  $\mu$ M di Miriocina, si è verificato uno spostamento immediato verso un singolo picco a 425 nm (linea tratteggiata), indicando la formazione di un complesso aldimina PLP-Miriocina. Oltre le 16 ore questo spettro rimane invariato (linea tratteggiata), indicando che il complesso aldimina PLP-Miriocina non viene degradato da questo enzima mutante<sup>25</sup>.

Per il complesso SPT:PLP:miriocina è stato ipotizzato un meccanismo di tipo retro-aldolico (Fig. 20), che modifica covalentemente il legame con la Lys<sup>265</sup>, portando all'inattivazione irreversibile dell'enzima. La spettrometria di massa ha mostrato la presenza di un addotto covalente di SPT (**14** in Fig. 20) con massa 47.509 Da, suscettibile a riduzione per opera di NaBH<sub>4</sub> del gruppo chetonico in posizione 12 e dell'addotto imminico SPT-octadecile (Fig. 21).

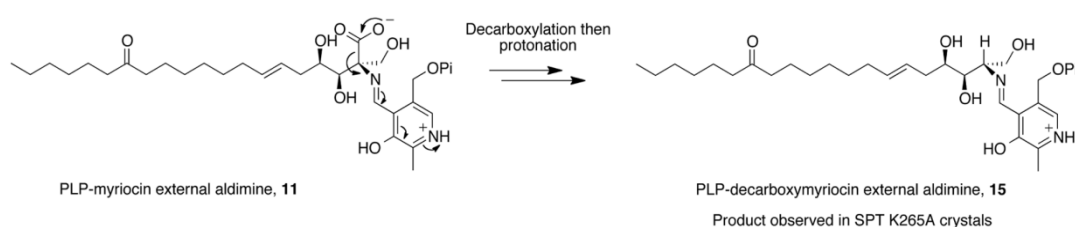


**Fig. 20:** La miriocina reagisce con PLP nel sito attivo per formare il complesso inibitorio PLP-Miriocina aldimina esterna (11), questa specie è stabile per più di un'ora a temperatura fisiologica ed è reversibile dopo l'aggiunta di un eccesso di PLP. PLP-Miriocina aldimina 11 si decompone dopo oltre 16 ore, a temperatura fisiologica, per produrre un'aldeide a lunga catena 12 che reagisce con il sito attivo della lisina per formare un' immina, rendendo l'enzima inattivo. Questa modifica covalente può essere classificata come inibizione suicida<sup>25</sup>.



**Fig. 21:** Spettrometria di massa delle proteine di SPT (40  $\mu$ M) prima (in alto) e dopo (in basso) 16 ore di trattamento con 200  $\mu$ M di Miriocina a 25 ° C. SPT mostra una massa media neutra di 47 231 Da. Dopo il trattamento con Miriocina si osserva una nuova importante specie di massa media 47509 si osserva ( $\Delta$ mass 278 Da). Picchi minori evidenziati da \* derivano da  $\alpha$ -N-gluconazione del residuo di istidina<sup>25</sup>.

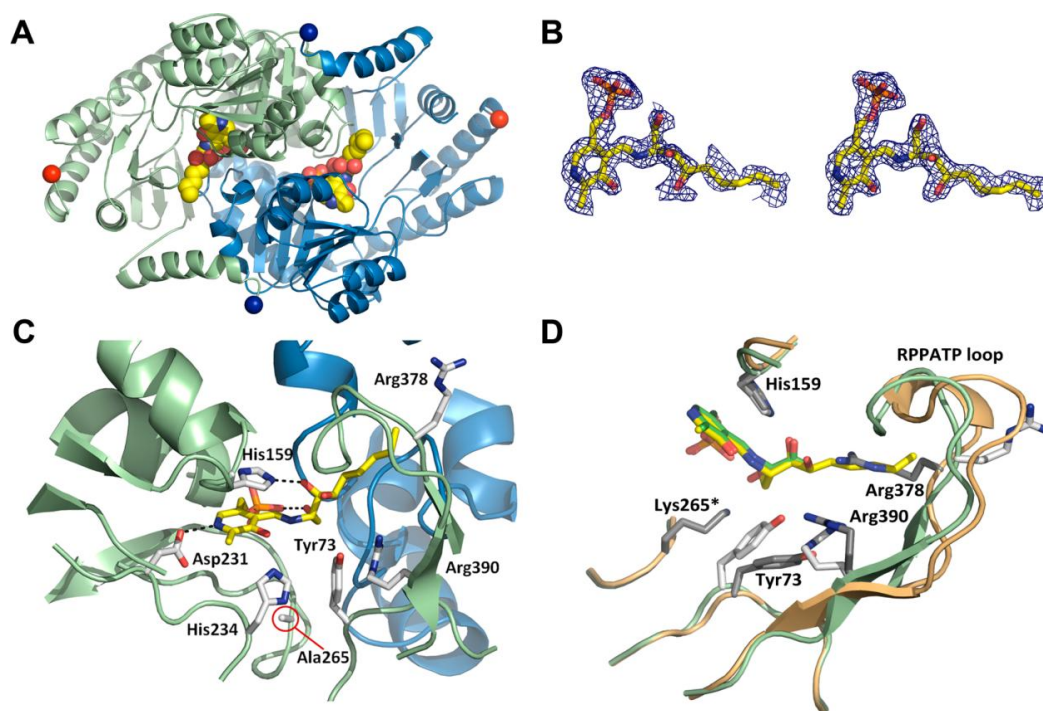
Ad oggi non è stato possibile preparare cristalli del complesso naturale PLP-miriocina a causa della degradazione del complesso aldiminico e per tale motivo è stato usato SPT K265A inattivo per “catturare” l’aldimina esterna. Tale complesso risulta stabile e si decompone solo dopo sette giorni con una reazione di decarbossilazione (Fig. 22). E ciò è dovuto al fatto che presenta un orientamento non ottimale (“Dunathan conformazione”), suggerendo il ruolo cruciale della Lys<sup>265</sup> nella decarbossilazione del complesso SPT:PLP-miriocina.



**Fig. 22:** Meccanismo di decarbossilazione di PLP-miriocina aldimina esterna osservato nella struttura cristallina di SPT K265A<sup>25</sup>.



Da studi sulla struttura cristallina così ottenuta è stato evidenziato che i residui conservati, His<sup>159</sup>, Asp<sup>231</sup> e His<sup>234</sup> sono tutti nelle stesse posizioni relative all'interno del sito attivo. Inoltre il gruppo di testa CH<sub>2</sub>OH della Miriocina interagisce con il 5'-fosfato del PLP. Il 3,4-cis-diolo della decarbossimiriocina forma legami a idrogeno con la proteina ed in particolare il gruppo 3-idrossi della Miriocina con il residuo catalitico His<sup>159</sup> (Fig. 23).



**Fig. 23:** **(A)** Dimero biologico del complesso decarbossilato della Miriocina. La proteina è mostrata con una subunità di colore verde pallido e una azzurra. L'aldimina esterna PLP- myriocin decarbossilato (15) è rappresentata con atomi di carbonio in giallo, l' azoto in blu e fosforo in arancione. Gli azoti terminali sono contrassegnati come sfere blu scure e i C-terminali come sfere rosse. **(B)** a sinistra: la mappa Fo-Fc (filo blu sagomato a 1.8  $\sigma$ , raggio di 1.5 Å) calcolata da un modello che non aveva mai contenuto PLP e Mirocina. Gli atomi sono colorati come in (A). A destra la mappa finale Fo-Fc sagomata a 0.85  $\sigma$  e raggio di 1.8 Å. **(C)** Rappresentazione dettagliata delle interazioni del sito attivo, gli atomi di carbonio sono colorati in giallo e rappresentati come bastoncini per il PLP-decarbossimiriocina, gli atomi di carbonio delle catene laterali proteiche sono indicati come bastoncini bianchi, gli altri sono colorati come in (A). La catena idrocarburica di mirocina si inserisce in una tasca idrofoba. **(D)** Sovrapposizione dell'aldimina esterna PLP-decarbossimiriocina (colorato come prima) con PLP-L-serina 2W8J aldimina esterna (arancio pallido, carboni delle catene laterali delle proteine in grigio scuro, carboni aldimina di colore verde, altri atomi sono colorati come prima). Il residuo catalitico chiave Lys<sup>265</sup> è mutato a Ala nel complesso Miriocina decarbossilato<sup>25</sup>.

Lo studio di modellistica molecolare per tale struttura giustifica la degradazione retro-aldolica dell'aldimina esterna PLP-Miriocina (**11**) nell'aldeide corrispondente C18 (**12**). La “neonata” specie aldeidica C18 subisce l'attacco da parte della Lys<sup>265</sup> per formare l'addotto covalente modificando il residuo chiave di lisina in modo irreversibile. Per cui il blocco dell'accesso al sito attivo, impedisce la rigenerazione di PLP in tempi biologicamente compatibili<sup>25</sup>.

## 5 RETINITE PIGMENTOSA

La retinite pigmentosa (RP) è una distrofia retinica ereditaria causata da una perdita progressiva di fotorecettori e si stima che nel mondo abbia una diffusione di circa 1/4000 persone. Tipicamente il primo sintomo della malattia è la cecità notturna, seguita da una perdita di visione periferica ed in molti casi la degenerazione dei coni nella fase tardiva è associata a un alterato elettroretinogramma (ERG).

Ad oggi per tale patologia sono associati 49 geni, 32 dei quali associati alla retinite pigmentosa autosomica recessiva. Tuttavia solo in poco più del 50% dei casi, la RP può essere spiegata con la mutazioni di questi geni<sup>26,27</sup>. La morte dei fotorecettori può avvenire attraverso due meccanismi: apoptotico e non-apoptotico<sup>28</sup> e attualmente non esiste una terapia farmacologica in grado di arrestare l'evoluzione della malattia basata sulle mutazioni dei geni coinvolti nella funzionalità dei bastoncelli e nel loro metabolismo.

In molte patologie neurodegenerative ed infiammatorie un aumento dei livelli intracellulari di ceramide è stato identificato come principale effettore di morte cellulare. Un legame genetico diretto tra la degenerazione della retina e l'apoptosi mediata da sfingolipidi è stato evidenziato dalla scoperta di una mutazione genetica in CERKL (un gene che esprime la proteina per la ceramide chinasi) che causa la perdita della funzionalità retinica e la RP autosomica recessiva<sup>29</sup>.

I livelli di ceramide possono essere aumentati con la sintesi *de-novo* oppure attivando la sfingomielinasi intracellulare che idrolizza gli sfingolipidi complessi portando alla formazione di ceramide. Il modello di RP di *Drosophilla* è caratterizzato da una diminuzione dei livelli intracellulari di ceramide e dei suoi effetti protettivi verso la funzionalità retinica<sup>30</sup>.

Anche l'introduzione di ceramidasi, un enzima che idrolizza la ceramide, provoca una diminuzione dei livelli intracellulari di ceramide e della funzione protettiva.

Nella linea cellulare dei fotorecettori 661W murini, lo stress ossidativo può aumentare i livelli di ceramide, che porta a morte cellulare grazie all'attivazione della via apoptotica mitocondriale e della cascata della caspasi<sup>31</sup>. Pertanto, l'inibizione della biosintesi di ceramide, può rappresentare un approccio terapeutico per il trattamento di questa malattia nell'uomo.

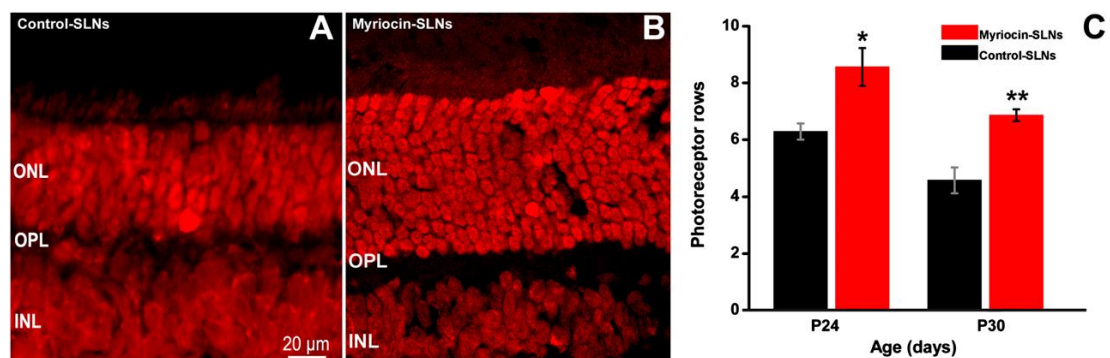
Un modello utile per la RP umana è rappresentato dalla linea di topi rd10<sup>32</sup>, che presenta una mutazione missenso dell'esone 13 nella subunità  $\beta$  del gene specifico per la fosfodiesterasi e mima la forma di RP autosomica umana. Nei topi rd10 i livelli di ceramide retinica risultano aumentati in corrispondenza della terza settimana di vita, che corrisponde al periodo massimo di morte dei fotorecettori, così come nella RP umana. Questi livelli elevati sono costanti per il periodo successivo, mentre nei topi normali i livelli di ceramide diminuiscono durante lo stesso periodo, raggiungendo un plateau dopo la piena maturità della retina. La morte dei bastoncelli inizia circa a 12 giorni di vita (P12) e raggiunge i picchi massimi a 24 giorni di vita (P24). Infatti l'elettroretinogramma (ERG) generato dai bastoncelli può essere registrato dai 25 (P25) fino ai 45 giorni di vita (P45) a causa della morte dei coni della retina. La degenerazione dei bastoncelli presenta i tratti caratteristici di processi apoptosi<sup>33</sup>.

Nei modelli di RP dei topi rd10 sono state somministrate singole somministrazioni intraoculari di Miriocina 0.5 nM (1  $\mu$ L di soluzione di 3,77 mM in DMSO) ed hanno ridotto in modo significativo i livelli di ceramide (17,5 %) rispetto al controllo, salvando i fotorecettori da morte per apoptosi, mentre i livelli di ceramide nel modello naturale non si sono ridotti significativamente (determinati con il test del diacilglicerolo chinasi).

La somministrazione trans-oculare consiste in una sospensione di nanoparticelle lipidiche solide (SLNs) cariche di Miriocina (diametro di 40-200 nm), che permette il trasporto del farmaco nei tessuti oculari.

La concentrazione del farmaco nei vari preparati, considerati idonei per l'uso nei topi rd10, varia dallo 0,4 a 1,0 mM (media, 0,6 mM) e il trattamento a lungo termine con questo collirio permette una riduzione dei livelli di ceramide del 40,6 % con una riduzione della perdita di funzionalità retinica.

Analisi istologiche (Fig. 24) dimostrano che i topi rd10 trattati con Mirocina presentano una normale morfologia della retina ed un eccellente mantenimento della struttura delle cellule gangliari: il trattamento prolungato (oltre i 20 giorni) con le nanoparticelle lipidiche solide aumenta la sopravvivenza dei fotorecettori e migliora la capacità della retina di rispondere alla luce (dimostrata dal ERG). Questi dati per quanto descritto precedentemente mettono in evidenza l'utilità degli inibitori SPT<sup>34</sup> come strumenti utili per il trattamento farmacologico della retinite pigmentosa<sup>34</sup>.



**Fig. 24:** effetti delle nanoparticelle di Mirocina-SLNs sulla morfologia retinica. (A e B) sezioni verticali della retina dei topi rd10 (A) trattati con SNLs di controllo e (B) trattati con mirocina-SNLs per 10 giorni (da P14 a P24). Lo strato nucleare esterno (ONL) della retina trattata con Mirocina è più spesso perché contiene più file di fotorecettori, rispetto alla retina di controllo. INL, strato nucleare interno; OPL, strato plessiforme esterno. (C) quantificazione delle file di fotorecettori a P24 e P30 nei topi rd10 trattati con mirocina-SNLs o SNLs di controllo. I dati sono una media e SE<sup>26</sup>. \* P= 0,002, \*\* P= 0,003 t test.

## 6 ALZHEIMER

Il morbo di Alzheimer (AD) è la forma più comune di demenza, è stata descritta per la prima volta nel 1906 dal neuropatologo Alois Alzheimer.

La malattia è caratterizzata da un'insufficiente memoria a breve termine, disturbi del linguaggio (afasia), confusione, irritabilità, perdita di giudizio e della capacità di ragionamento. Un'altra caratteristica è la carenza di acetilcolina e la conseguenza anatomica di

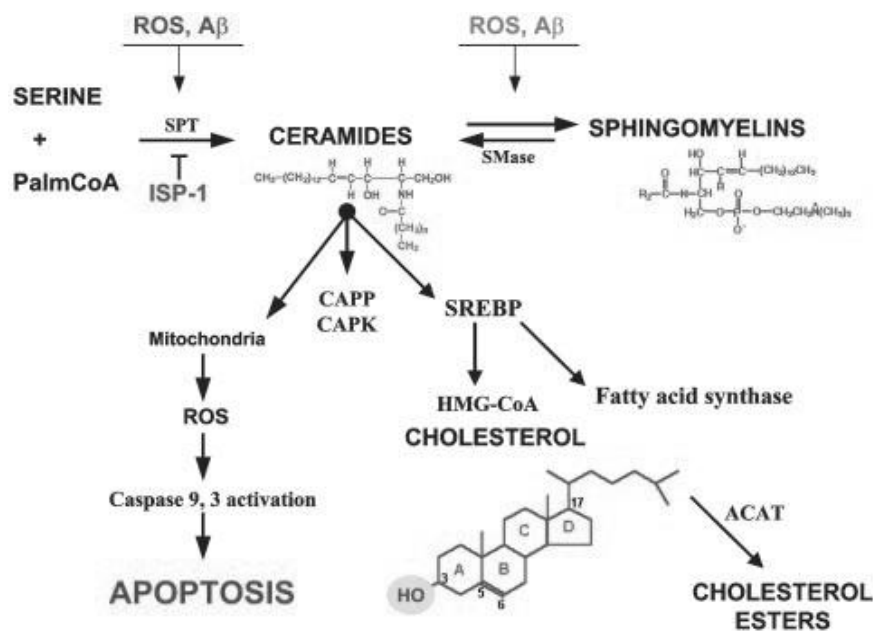
tale deficit risulta essere l'atrofia e la degenerazione dei neuroni colinergici sottocorticali (soprattutto nel proencefalo basale). Questa regione del cervello fornisce innervazione colinergica alla corteccia cerebrale, coinvolgendo più sistemi tra cui la serotonina, il glutammato e altri neuropeptidi. Nell'AD non sono coinvolti solamente i neuroni colinergici, ma anche quelli corticali e dell'ippocampo. Nelle fasi iniziali (stadi clinicamente silenti) avviene la degenerazione dei neuroni e la formazione di placche nella corteccia ippocampale, mentre negli stadi più avanzati sono coinvolti il sito limbico e neocorticale (AD conclamato).

Analisi microscopiche hanno mostrato la presenza di una grande quantità di grovigli neurofibrillari intracellulari (NFT), costituiti in microtubuli, associati alla proteina tau nella sua forma iperfosforilata e insolubile.

Inoltre, sono presenti depositi di amiloide extracellulari in forma di placche senili (SP), costituiti da un nucleo di  $\beta$ -peptide amiloide ( $A\beta$ ). La gravità della compromissione è approssimativamente proporzionale all'abbondanza di grovigli e placche. Le fibrille osservate, sono depositate in forma di  $\beta$ -foglietto mal ripiegato, chiamato  $\beta$ -amiloide. Questi componenti appaiono elevati nell'ippocampo e nelle regioni associative della corteccia, determinando la forma più grave di danno neuronale. Gli astrociti e i neuroni ippocampali che presentano  $\beta$ -amiloide mostrano i cambiamenti caratteristici dell'apoptosi con perdita di neuroni in maniera non uniforme, in relazione alle funzionalità delle diverse regioni cerebrali. La proteina precursore dell'amiloide (APP) è una glicoproteina di superficie che ha attività neuroprotettiva e neurotrofica e mutazioni nei geni che la codificano, unitamente a quelle che codificano per proteine note come preseniline (PS1 e PS2), portano alla formazione del  $A\beta$ . Le preseniline e le loro forme mutate (mutazione nel gene PS1 sul cromosoma 14 e nel gene PS2 sul cromosoma 1) partecipano al procesamiento di APP, che porta alla produzione del peptide  $\beta$ -amiloide 4-kDa di varie lunghezze, prevalentemente 40-42 amminoacidi (chiamato  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  rispettivamente). La produzione di  $A\beta$  dalla APP sembra derivare da un taglio proteolitico alterato da parte dell'enzima BACE 1<sup>34-38</sup>.

L'apolipoproteina E (apo E) è stata identificata come probabile fattore di rischio genetico per il morbo di Alzheimer, è coinvolta nel trasporto del colesterolo e dei lipidi nel sangue. Il meccanismo mediante il quale l'apo E aumenta il rischio di sviluppare l'AD è ancora sconosciuto, ma è stato suggerito un meccanismo secondario di aggregazione o trasformazione dell'APP in  $\beta$ -amiloide.

Livelli adeguati di ceramide intracellulari risultano necessari per la differenziazione dendritica e per le cellule del Purkinje<sup>39-41</sup>, mentre ceramidi esogene inducono la morte di neuroni e di astrociti in coltura<sup>42,43</sup>. Elevati livelli di ceramide dimostrano essere un fattore di rischio per l'Alzheimer, infatti è stato osservato un significativo aumento della ceramide come effettore di morte neuronale nei pazienti con Alzheimer che presentano A $\beta$  rispetto ai pazienti di controllo suggerendo un'interazione molecolare tra A $\beta$  e ceramide<sup>44-46</sup>. L'accumulo di A $\beta$  può causare stress ossidativo<sup>47,48</sup>, come dimostrato dall'aumento dei livelli di 4-idrossinonenale (4-HNE, prodotto di perossidazione lipidica), nei neuroni esposti a A $\beta$ . Mentre l'alterazione del metabolismo di membrana, aumenta i livelli di ceramide e quelli di sfingomielina, alterando la funzionalità epatica e causando degenerazione e morte neuronale (Fig. 25). Inoltre l'alterazione del metabolismo di ceramidi e del colesterolo aumenta la scissione di  $\gamma$ -secretasi di APP con aumento la produzione di A $\beta$ <sup>49</sup>.



**Fig. 25:** Percorsi del metabolismo di sfingomielina, ceramide e colesterolo, la loro modulazione ad opera dello stress ossidativo, e il loro possibile ruolo nella morte neuronale in AD. La produzione di sfingomielina da serina e palmitoil CoA è catalizzata dall'enzima serina palmitoiltrasferasi (SPT). Le ceramidi sono sintetizzate come precursori della sfingomielina e sono inoltre sintetizzate per idrolisi della sfingomielina dall'enzima sfingomielinasi (Smase). L'esposizione delle cellule a specie reattive dell'ossigeno e A $\beta$  induce la produzione di ceramide. CAPK, ceramide-attivata protein chinasi; CAPP, ceramide-attivata protein fosfatasi<sup>48</sup>.

In condizioni patologiche, la ceramide facilita la dislocazione di BACE 1 e  $\gamma$ -secretasi all'esterno delle “rafts” lipidiche, dove avviene la scissione delle secretasi di APP che porta alle  $A\beta^{50,51}$ . Inoltre SPT risulta aumentata e correlata positivamente con  $A\beta$  nelle cortecce cerebrali umane, regolandone la concentrazione nel siero e nel cervello. Topi ibridi non modificati (C57/B16 x C3H) sono stati sottoposti ad una dieta con un alto contenuto di grassi della durata di 5 mesi (a partire da 4 mesi di età) in cui si è evidenziato un aumento dei livelli di SPT, mentre nello stesso studio in cui la dieta è durata 3 mesi non si è avuto lo stesso aumento, suggerendo che la durata del consumo di cibo ad alta percentuale di grassi potrebbe avere effetto sui processi metabolici.

Anche in questi studi l'inibitore naturale L-cicloserina (LCS) ha portato, in vitro e in vivo, ad una riduzione dei livelli di cerebrosidi, sostanze che presentano un singolo residuo glucidico (testa polare)<sup>52</sup>.

Un potenziamento cognitivo è stato osservato in pazienti con AD in uno studio in doppio-cieco con il trattamento della cicloserina (100 mg/die per 14 giorni). In un modello di insorgenza precoce di AD nei topi transgenici (TgCRND8), confrontato con topi alimentati con una dieta ricca di grassi ed anche in confronto a topi alimentati con una dieta di controllo, la somministrazione di LCS causa una diminuzione dei livelli proteici di SPT corticali, definendo una correlazione positiva con i livelli di ceramide e  $A\beta^{42}$  in tutti i topi appartenenti ai gruppi di studio. Inoltre LCS causa una diminuzione della proteina tau iperfosforilata e una riduzione dei livelli di GSK3B (una chinasi che media la fosforilazione della proteina tau). La somministrazione di dosi elevate (100 mg/kg) di LCS riduce immediatamente i livelli di SPT cerebrali con perdita di peso, mentre a basso dosaggio (25 mg/kg) dà gli analoghi effetti senza la perdita di peso. La somministrazione cronica di LCS (per mezzo di una pompa osmotica intraperitoneale impiantata chirurgicamente) non cambia l'istologia del cervello, la morfologia, la mielinizzazione o la memoria nei topi sani con livelli sierici di LDH immutati<sup>53</sup>.

## 7 NEUROPATIA EREDITARIA SENSITIVA ED AUTOSOMICA DI TIPO 1 (HSAN 1)

HSAN 1 è una condizione caratterizzata da anomalie dei nervi delle gambe e dei piedi (neuropatia periferica). Molte persone in questa condizione sentono formicolio, debolezza e una ridotta capacità di percepire il dolore ed il senso di caldo o freddo. Alcuni individui non perdono la capacità di sentire le sensazioni, ma sentono dolori lancinanti nelle gambe e nei piedi. Quando la malattia progredisce, le anomalie sensoriali possono influenzare le mani, le braccia, le spalle e l'addome<sup>54,55</sup>.

L'HSAN1 è causata da mutazioni nel gene SPTLC1, sul cromosoma 9q22.1-22.3, che modula la sintesi di una subunità dell'enzima SPT coinvolto nella sintesi degli sfingolipidi. Queste mutazioni riducono la quantità della subunità SPTLC1 che viene prodotta, sintetizzando un enzima SPT con funzione ridotta, causando in ultima analisi una diminuzione della produzione di sfingolipidi ed un accumulo dannoso di alcuni sottoprodotti.

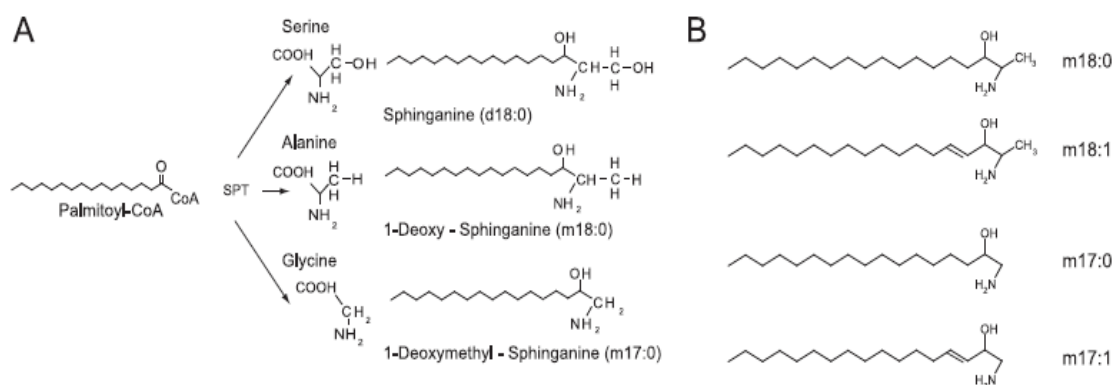
Una diminuzione degli sfingolipidi modifica la formazione della mielina, dando cellule nervose meno efficienti, mentre l'accumulo dei sottoprodotti tossici può provocare la morte delle cellule nervose. La morte progressiva delle cellule nervose, si traduce in perdita di sensibilità e debolezza muscolare in persone affette da HSAN1.

Analizzando 24 famiglie dei pazienti HSAN1, sono state individuate quattro mutazioni non senso: C133W, C133Y (nell' esone 5), V144D (nell'esone 6) e G387A (nell' esone 13). La mutazione osservata più frequentemente è C133W, mentre G387A è una mutazione relativamente non comune e non sembra essere patogena.

Le cellule possono generare ceramidi anche dalla degradazione di sfingomieline provenienti da fonti esterne e quindi sono in grado di compensare la sintesi *de novo* ridotta di ceramide<sup>56,57</sup>. Per analizzare il livello totale di sfingolipidi e la correlazione con la sintesi *de novo* di ceramide, è stato utilizzato Miriocina l'inibitore di SPT, la ceramide sintasi (CER) e l'inibitore fumosina B1 (FB1), che portano ad un accumulo di sfingolipidi (permettendo di osservare il tipo di sfingolipidi accumulato). Nei HEK133W e HEK133Y che esprimono la linea cellulare mutante SPTLC 1, si ha una riduzione del 50% dei livelli di sfingolipidi che utilizzano FB-1, rispetto alle cellule che non esprimono il mutante SPTLC1. Studi LC ESI-MS hanno rivelato un picco insolito nelle linee cellulari con il mutante, che scompare con il trattamento con Miriocina, suggerendo una correlazione diretta tra SPT e il picco rilevato.



Continuando gli studi in sim, l'analisi di tale picco ha rivelato due metaboliti differenti con rapporto massa su carica ( $m/z$ ) di 462,3 e 448,3, questi corrispondono a 16 Da (perdita di un ossigeno) e 30 Da (perdita del gruppo idrossimetilico) in meno rispetto alla sfinganina (SA) che possiede un valore di  $m/z = 478.3$ . Diverse analisi hanno dimostrato che questi metaboliti presentano un nucleo sfingoide senza il gruppo ossidrilico in C1, quindi sono chiamati basi desossi-sfingoidi (DSB) (Fig. 26).



**Fig. 26:** (A) Prodotti della reazione SPT usando come substrato serina, alanina, glicina. La coniugazione di palmitoil-CoA con alanina e glicina porta alla formazione delle due DSB: m18: 0 e m17: 0. Struttura (B) chimica delle DSB. Il numero di ossidrilici è indicato con m (per mono) ed (per di-) seguito dal numero di atomi di carbonio. Il secondo numero indica i doppi legami. Ad esempio, D18: 0 sta per sfinganina, e D18: 1 sta per la sfingosina. Tutti i metaboliti visualizzati sono stati trovati anche nella forma N-acetilato<sup>60</sup>.

I due metaboliti identificati provengono dalla coniugazione di palmitoil-CoA con alanina, infatti, quando le cellule HEK133W e HEK133Y sono trattate con alanina (10 mM) e glicina (10 mM) e la sintesi de novo è bloccata con FB1, i livelli di 1-desossi-sfinganina e 1-desossi-metil-sfinganina risultano aumentati rispettivamente di 4 volte e 10 volte, suggerendo che le mutazioni HSAN1 inducono un cambiamento nell'affinità di substrato di SPT da serina verso alanina e glicina.

Le DSB sono successivamente metabolizzate, ma non secondo la via classica e la mancanza di gruppi ossidrilici e idrossimetilici inibisce la formazione di sfingolipidi altamente sostituiti, come fosfo- e glico-sfingolipidi.

Questi substrati non possono essere degradati per via classica a causa dall'incapacità di formare un legame fosfo-esterico in corrispondenza del C1.

Inoltre le DSB sono substrati dell'enzima ceramide sintasi, le quali vengono N-acilate e

desaturate dall'enzima ceramide desaturasi (DES), che provoca la formazione di desossi-ceramide e desossi-metil-ceramide.

Nel plasma umano degli individui affetti da HSAN1 infatti sono stati rilevati alti livelli di DSB insaturi rispetto a quelli saturi e alti livelli di DSB sono correlati con il fenotipo di HSAN1 più grave di, mentre livelli più bassi sono associati ad un fenotipo di HSAN1 più moderato.

Analisi quantitative hanno evidenziato un effetto dose-dipendente di DSB sulla crescita dei neuriti e una riduzione dose-dipendente sulla lunghezza dei neuriti.

Infatti, quando ai DRG (gangli spinali) dei neuroni in coltura, vengono aggiunti SA (1  $\mu$ M), 1-desossi-sfinganina (1  $\mu$ M) e 1-desossi-metilsfinganina (1  $\mu$ M), si ha una riduzione delle cellule che presentano 1 o più neuriti (riduzione del 30%) rispetto al controllo, suggerendo che le DSB disturbano la formazione di neuriti. Inoltre, quando DSB vengono aggiunte alla SA delle cellule in coltura, si ha sempre una notevole regressione del neurite già formato. Analisi di immuno-fluorescenza suggeriscono che le DSB cambiano la stabilità e la dinamica di formazione dei neurofilamenti.

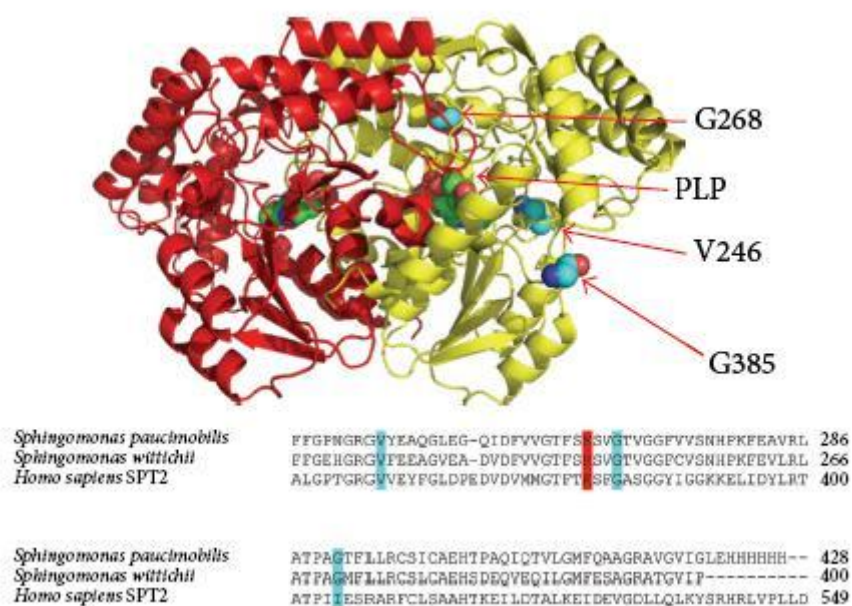
Infatti l'actina e i neurofilamenti sono localizzati su tutta la lunghezza del neurite nei neuroni che sono coltivati in presenza di SA, mentre i neuriti dei neuroni sono coltivati in presenza di 1-desossi-sfinganina e hanno una struttura del citoscheletro chiaramente disturbata.

La colatura dei neurofilamenti è significativamente ridotta e solo in parte localizzata con l'actina, mentre quest'ultima viene rilevata su tutta la lunghezza del neurite, suggerendo che il meccanismo patologico HSAN1 è costituito dall'accumulo di questi metaboliti neurotossici piuttosto che dalla ridotta sintesi de novo degli sfingolipidi<sup>58-60</sup>.

Studi molto recenti, condotti da Rotthier *et al.*, hanno permesso di identificare tre diverse mutazioni (V359M, G382V, e I504F) nella subunità hLCB2a.

È stato scoperto che ogni mutazione abbassa l'attività dell'eterodimero hLCB1/hLCB2a ed è anche in grado di generare diversi tipi di desossi-sfinglipidi.

Per scoprire l'impatto di queste mutazioni sul legame con PLP, sulla struttura e l'attività di questo hanno utilizzato mutanti dell'enzima batterico solubile, che imita SPT umano, rivelando che ogni mutazione ha un diverso impatto sull'enzima (Fig. 27).



**Fig. 27:** struttura ad alta risoluzione dell'omodimero *Sp SPT*, PLP-serina aldimina esterna che mostra la posizione delle tre mutazioni correlate (PDB: 2W8J). Ogni monomero è colorato (rosso e giallo). Allineamento di sequenze di batteri *Sp SPT* (UniProt Codice: Q93UV0) con batteri *Sw SPT* (codice UniProt: A5VD79) e *hLCB2a* umana (codice UniProt: O15270). Il residuo catalitico chiave della lisina (K265) coinvolto nella formazione dell'aldimina interna è di colore rosso e imita le *HSAN1* mutanti (V246M, G268V e G385F) di colore azzurro<sup>61</sup>.

Analizzando i dati sperimentali è stato dimostrato che ciascuno dei nuovi mutanti *hLCB2a* ha un piccolo impatto sull'attività dell'enzima *SPT* e che ciascun enzima mutato è ancora attivo grazie alla presenza di piccole subunità di *SPT* (*ssSPTa* e *ssSPTb*)<sup>61</sup>.

## 8 INSULINO RESISTENZA

La resistenza all'insulina è definita clinicamente come l'incapacità di una quantità nota di insulina esogena o endogena di aumentare l'assorbimento e l'utilizzo di glucosio in un individuo.

L'attività dell'insulina è la conseguenza del legame al suo recettore di membrana ed è trasmessa attraverso la cellula da una serie di interazioni proteina-proteina. Due grandi cascate di interazioni proteina-proteina mediano l'azione dell'insulina intracellulare: una via è coinvolta nella regolazione del metabolismo intermedio e l'altra svolge un ruolo nel controllo dei processi di crescita e mitosi. La regolazione di questi due percorsi distinti può essere dissociata. In effetti alcuni dati suggeriscono che la via che regola il metabolismo intermedio è diminuita nel diabete di tipo 2, mentre quella che regola i processi di crescita e mitosi è normale. Sono stati proposti diversi meccanismi come possibili cause dello sviluppo della resistenza all'insulina e la sindrome da insulino-resistenza. Queste includono: le anomalie genetiche di una o più proteine della cascata dell'azione dell'insulina, la malnutrizione fetale e l'aumento dell'adiposità viscerale.

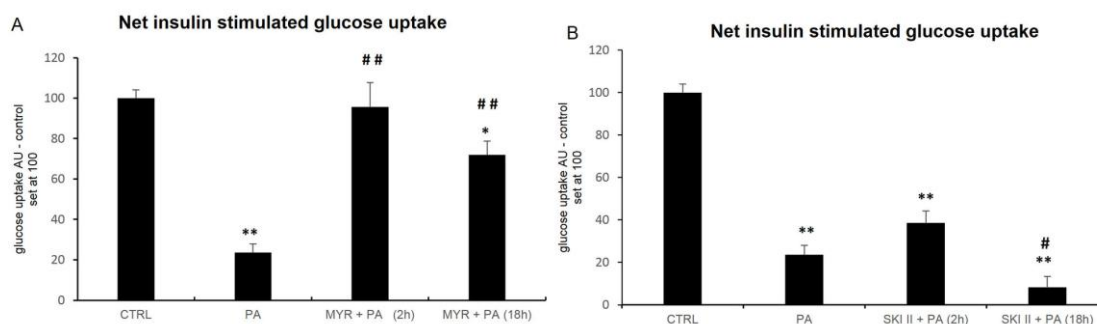
L'insulino-resistenza si verifica come parte di un gruppo di anomalie cardiovascolari e metaboliche comunemente denominato "La sindrome da insulino-resistenza" o "sindrome metabolica". Questo gruppo di anomalie può portare allo sviluppo di diabete di tipo 2, aterosclerosi accelerata, ipertensione o sindrome dell'ovaio policistico a seconda del background genetico dell'individuo. Occorre considerare se l'insulino-resistenza deve essere definita come una malattia e quindi essere diagnosticata e trattata con farmaci specifici per migliorare l'azione dell'insulina<sup>62</sup>.

In condizioni di IR, le cellule pancreatiche  $\beta$  producono insulina, ma le cellule diventano resistenti a questo ormone e non sono in grado di usarlo portando ad iperglicemia. Quindi le cellule del pancreas aumentano la loro produzione di insulina contribuendo all'iperinsulinemia.

Recentemente è stato scoperto il ruolo fondamentale degli sfingolipidi come mediatori dell'insulino-resistenza. Gli sfingolipidi sono importanti costituenti della membrana cellulare, tra questi fanno parte le ceramidi che giocano un ruolo essenziale in numerosi processi cellulari tra cui la crescita, la differenziazione, l'arresto del ciclo cellulare, l'invecchiamento, la sopravvivenza ed l'apoptosi. Le ceramidi possono accumularsi nelle cellule attraverso due vie principali: l'idrolisi della sfingomieline di membrana o sintesi

de novo da acidi grassi a lunga catena (LCFAs). Nella sintesi *de novo*, l'enzima serina palmitoiltransferasi è responsabile della condensazione di un acido grasso acil-CoA, di solito palmitoil-CoA, con la serina per formare 3-chetosfinganina. Gli ultimi due step di questa via comportano la formazione di diidroceramide da sfinganina (SFA), grazie all'azione dell'enzima diidroceramide sintasi e si trasforma poi in ceramide per opera della diidroceramide desaturasi. Diversi studi hanno dimostrato che l'apporto eccessivo di palmitato (PA), acido grasso saturo, provoca insulino-resistenza, causata da notevole accumulo di ceramide, che interferisce con vie di segnalazione dell'insulina.

Così Watson et al. (2009) hanno dimostrato che la via di sintesi *de novo* generata dal palmitato è un importante fattore di promozione dell'insulino-resistenza nelle fibrocellule muscolari<sup>63</sup>. L'inibizione di SPT con Miriocina è sufficiente a prevenire l'accumulo di ceramide nei miotubi L6 in coltura invertendo l'inibizione del trasporto del glucosio stimolato dall'insulina, indotto dal palmitato. Questi effetti benefici della Miriocina sia di breve (2 ore) che di lunga (18 ore) durata (Fig. 27), sono associati a livelli ridotti di SFA e ceramidi e analoghi effetti sono stati rilevati anche quando sono utilizzati altri inibitori della sintesi *de novo* di ceramidi come L-cicloserina (che inibisce anche SPT) e le fumonisina B1 (inibitore della diidroceramide sintasi). L'inibizione di SPT nell'insulino-resistenza indotta dal palmitato nelle cellule muscolari scheletriche in vitro è stata confrontata con gli effetti dell'inibizione della sfingosina chinasi 1 (SPK1), che catalizza la fosforilazione di sfingosina, che porta alla sfingosina 1-fosfato (S1P). SPK esiste in due isoforme distinte: SPK1 (dominante nel muscolo scheletrico) e SPK2. La sfingosina chinasi (SPK) svolge un ruolo importante nella regolazione dei relativi livelli di ceramide (CER), sfingosina (SFO) e sfingosina-1-fosfato (S1P). Queste molecole sono coinvolte in una varietà di processi cellulari e fisiologici. Nonostante la loro stretta omologia strutturale il ruolo biologico di questi lipidi è diverso e in molti casi addirittura opposto. In contrasto con l'azione di Miriocina, l'inibizione prolungata della SPK ad opera dei suoi inibitori di riferimento come SKI II esalta l'effetto del PA sull'assorbimento del glucosio insulino-stimolato nei miotubi L6 (Fig. 28).



**Fig. 28:** Net assorbimento del glucosio insulino-stimolato nei miotubi L6 in coltura con l'acido palmitico (PA) e **(A)** l'inibitore serina palmitoiltrasferasi - Myriocin (MYR) e **(B)** l'inibitore sfingosina chinasi 1 - SKI II. I miotubi L6 sono stati preincubati con 10  $\mu\text{mol/L}$  di MYR o SKI II per 2 ore [MYR/SKI II + PA (2 h)] e poi incubate con PA (0,4 mM) per le successive 16 h. In alcuni esperimenti, i miotubi L6 sono stati sottoposti ad incubazione con MYR o SKI II per 2 ore e durante le ultime 16 h di incubazione con gli inibitori della ceramide; le cellule sono state incubate anche in presenza di palmitato come indicato [MYR/SKI II + PA (18 h)]. Le cellule sono state esposte a quantitativi di insulina (100 nM) per 20 minuti per il test di assorbimento del glucosio. Per la misurazione di ciascun trattamento è stata presa la media dei sei pozzetti negli stessi esperimenti. I dati si basano su 3 determinazioni indipendenti. I dati sono riportati come media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  differenza significativa: controllo (CTRL) vs. trattamento. # $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  differenza significativa: PA vs trattamento<sup>64</sup>.

Inoltre è stato dimostrato che per trattamento con PA il suo effetto tossico aumenta significativamente per SKI II in seguito dall'inibizione dell'assorbimento di glucosio stimolato dall'insulina. Sulla base di questi dati, l'inibizione della sintesi di ceramide è un bersaglio promettente per migliorare la sensibilità del muscolo scheletrico all'insulina. La Miriocina migliora la sensibilità all'insulina sia nel trattamento a breve che a lungo termine, mentre l'incubazione con SKI II provoca un notevole accumulo di sfingosina, responsabile dell'insorgenza di IR all'interno del muscolo scheletrico<sup>64</sup>.

**INTRODUZIONE ALLA**  
**PARTE SPERIMENTALE**

Gli sfingolipidi (SL), componenti dello strato lipidico di membrana, sono ubiquitariamente distribuiti nelle cellule dei mammiferi, dei batteri e dei funghi.

Il primo step della biosintesi degli sfingolipidi è rappresentato dalla formazione della 3-chetodihidrospingosina (3-KDS) ottenuta attraverso la condensazione della L-serina e palmitoil-CoA, catalizzata da un enzima PLP dipendente, la serina palmitoiltransferasi (SPT). La 3-KDS successivamente viene ridotta a sfinganina, acilata a diidrocераmide dalla diidrocераmidasi sintetasi (CERs) e infine convertita in ceramide (sintesi *de novo*) dalla diidrocераmidasi desaturasi. La *de novo* ceramide svolge un'importante funzione nella regolazione degli eventi apoptotici e nell'ultimo decennio il suo coinvolgimento e quello di SPT è stato studiato in diversi tipi di patologie ed in particolare in quelle neurodegenerative. Quindi composti in grado di inibire SPT potrebbero rappresentare un approccio utile per la prevenzione o il trattamento di malattie associate ad alti livelli di questi metaboliti tossici oltre a rappresentare potenti strumenti per studi biochimici e farmacologici.

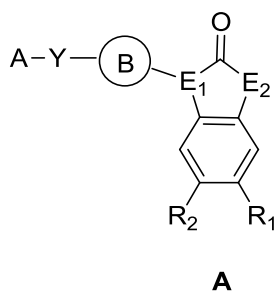
In letteratura sono noti diversi composti naturali ad attività inibitoria nei confronti di SPT. La maggior parte di questi non risultano essere selettivi infatti la L-cicloserina e  $\beta$ -cloro-L-alanina sono in grado di interferire con altre vie biochimiche inibendo diversi enzimi PLP-dipendenti.

Sempre nell'ambito dei composti naturali la Miriocina inibisce la biosintesi degli sfingolipidi attraverso l'inibizione di SPT, è un potente immunosoppressore (100 volte più efficace rispetto alla cicloserina) che ne preclude l'uso a lungo termine in patologie di tipo cronico. Altri composti naturali studiati come inibitori di SPT sono le Viridiofungine. Tali composti risultano essere meno potenti della Miriocina e scarsamente selettivi come inibitori di SPT in quanto sono in grado di inibire enzimi sensibili a acidi tri- e di-carbossilici come ad esempio lo squalene sintasi.

Il trattamento di malattie neurodegenerative rappresenta ancora oggi un importante filone di ricerca nel campo della chimica farmaceutica. Poiché negli ultimi anni è stato messo in evidenza il ruolo di SPT come destinazione innovativa per il trattamento di patologie a carico del sistema nervoso centrale, la ricerca di nuovi inibitori selettivi risulta essere sempre di crescente interesse. Infatti come detto precedentemente, tra i diversi inibitori naturali l'unico selettivo risulta essere la Miriocina, ma la sua struttura lipofila ne influenza negativamente il profilo farmacocinetico. Recentemente la casa farmaceutica Pfizer ha pubblicato un brevetto di composti a struttura 2-oxo-benzimidazolica con

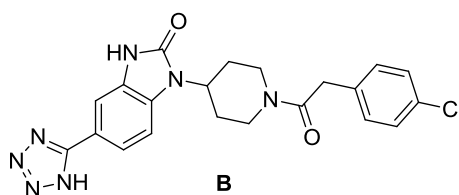


formula generale A dotati di una buona attività inibitoria verso SPT (Fig.29)<sup>65</sup>.



**Fig. 29**

Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio internato di tesi, da molto tempo è impegnato nella ricerca e sviluppo di composti attivi verso sistemi biologici coinvolti nella neurodegenerazione e poiché SPT risulta essere un target innovativo nel trattamento di tali patologie, con l'obiettivo di sviluppare un pool di nuovi inibitori SPT, sono stati sintetizzati diverse classi di derivati. Tra questi, un composto, caratterizzato da un nucleo centrale di tipo 2-oxo-benzimidazolico, non presente nel brevetto su citato, ha mostrato un'attività inibitoria interessante con  $IC_{50}$  nell'ordine del micro molare ( $IC_{50} = 19.42 \pm 4.9 \mu M$ ). (Fig. 30).

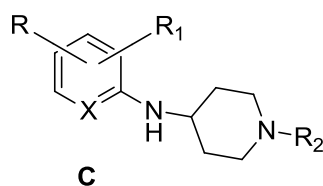


**Fig. 30**

Nell'ambito di tali studi sono stati sviluppati altri derivati ottenuti da modifiche strutturali sia del nucleo centrale, sia dei sostituenti presenti in varie posizioni e delle catene laterali.

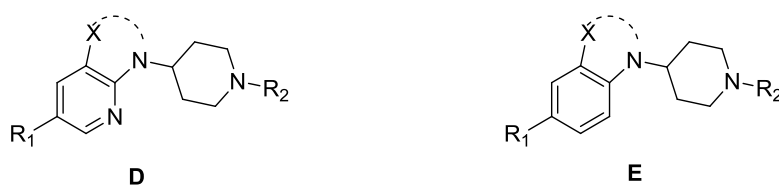
Dopo sperimentazione biologica, per alcuni di questi nuovi composti, è stato possibile riscontrare valori di attività di inibizione con  $IC_{50}$  molto interessanti. Poiché, ad oggi i

dati ottenuti dalle sperimentazioni biologiche non permettono una chiara correlazione tra le strutture molecolari e l'attività inibitoria per una preliminare valutazione del rapporto struttura-attività, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di progettare e sintetizzare nuovi derivati, attraverso strategie sintetiche alternative, di struttura generale **C** (Fig.31), che possano essere facilmente modificabili per ottenere molecole con strutture adeguate per l'interazione con l'enzima stesso e/o con il cofattore piridossal-5'-fosfato.



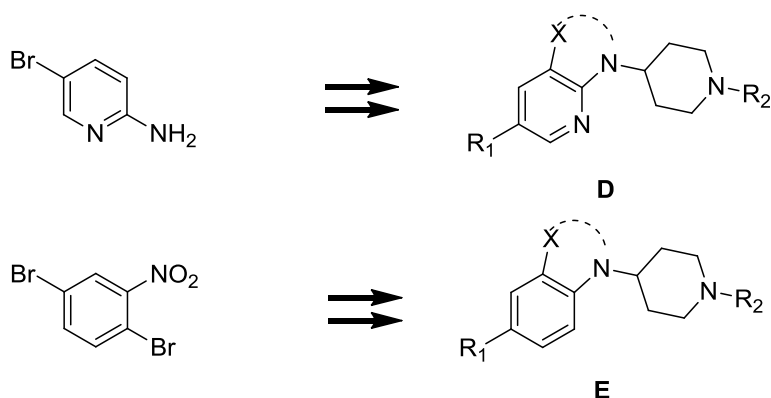
**Fig. 31**

A causa del numero limitato disponibile di precursori sintetici per ottenere derivati di formula generale **C**, in questo lavoro di tesi mi sono dedicata all'individuazione di strategie sintetiche per ottenere derivati di struttura generale **D** e **E** opportunamente funzionalizzati al fine di valutarne le proprietà inibitorie (Fig. 32).



**Fig. 32**

In particolare i derivati della piridina (composti **D**), sono stati sintetizzati utilizzando come materiale di partenza la 2-ammino-5-bromo-piridina, mentre per i derivati benzenici (composti **E**) è stato utilizzato il 1,4-dibromo-2nitrobenzene (Fig. 33).



**Fig. 33**

Per ottenere derivati di tipo D di sintesi, la 2-ammino-5-bromopiridina (*Schema 1*), è stata fatta reagire con il 4-Boc-piperidone, per dare un'amminazione riduttiva.

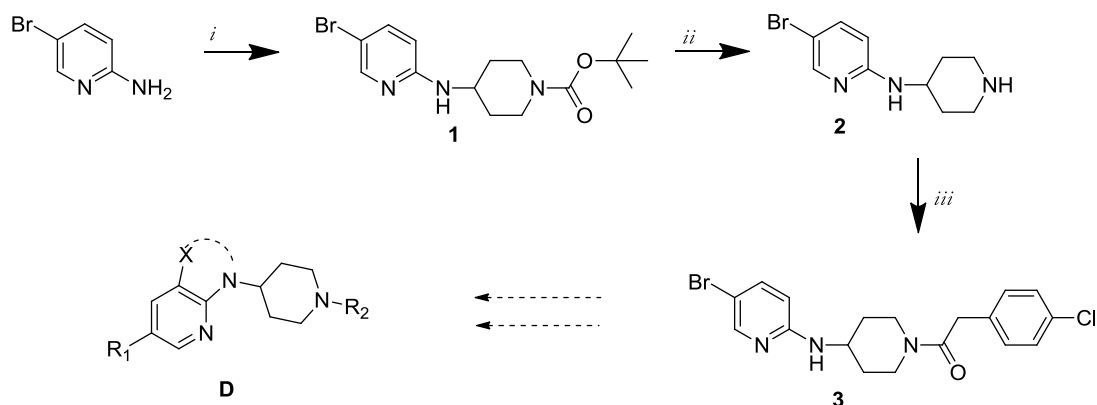
Il derivato imminico è stato ridotto *in situ* in presenza di acido acetico (glaciale) e triacetossi-sodio boroidruro in THF e diclorometano anidro. Questo agente riducente è stato scelto al fine di evitare una riduzione del chetone e la formazione di sostanze tossiche dal prodotto (prodotte dall'agente riducente, come cianoboroidruro di sodio)<sup>66</sup>.

Per ottenere una buona resa di **1** è stato richiesto un tempo di reazione di 48 ore. Il composto desiderato è stato ottenuto con rese del 59 % come una polvere bianca dopo purificazione per flash cromatografia.

Successivamente è avvenuta la deprotezione della piperidina, trattando il composto **1** con HCl 37 % in MeOH, la reazione è stata condotta in un bagno ad olio a 25° C per circa 5 ore, si è ottenuto così il prodotto **2** con una resa del 46 % dopo neutralizzazione e purificazione con lavaggi di CHCl<sub>3</sub>.

Il composto **2** è stato poi funzionalizzato con 4-cloro-fenilacetilcloruro in presenza di trietilammina, dimetilformammide e tetraidrofurano, portando al composto finale **3**, che è stato purificato attraverso dei lavaggi con Et<sub>2</sub>O e n-Esano (resa 43%).

## SCHEMA 1



**Reagenti e condizioni:** (i) diclorometano anidro, THF, 1-Boc-4-piperidone, acido acetico (glaciale), triacetossi sodio boroidruo, tempo di reazione 48h, temperatura ambiente; (ii) acido cloridrico 37%, metanolo, in un bagno ad olio a 25° C per circa 4h; (iii) 4-cloro-fenilacetilcloruro, trietilamina, DMF e THF, temperatura ambiente per 12h.

Per quanto riguarda i derivati piridinici, ho sintetizzato un altro composto secondo lo *Schema 2*: il composto 1 è convertito nel ciano-derivato 4, evitando l'uso di reagenti tossici come il cianuro di sodio.

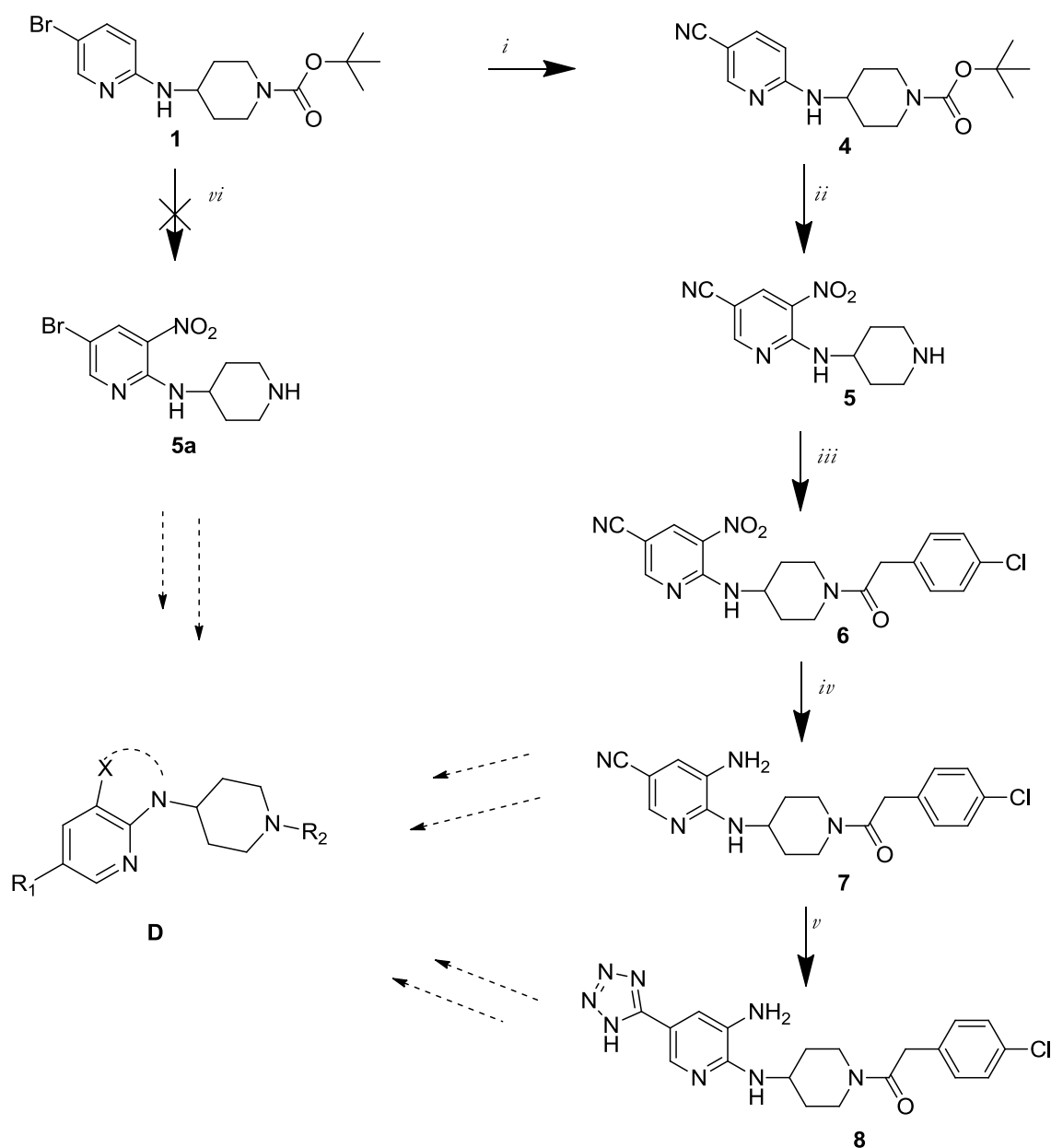
Il derivato 1 è stato riscaldato in presenza di ferrocianuro di potassio (II) triidrato, tetrakis (trifenilfosfina palladio(0)) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) in una miscela di terz-butanolo e acqua, sottovuoto e in atmosfera di azoto per ottenere il composto 4, un solido giallo chiaro, che è stato purificato mediante flash cromatografia (resa 75%)<sup>67</sup>. Successivamente il derivato 4 è stato sottoposto ad una reazione di nitratura, sciogliendo il composto in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato e HNO<sub>3</sub> al 65 %. Sperimentalmente è stato rilevato che contemporaneamente alla nitratura il reagente subisce una decarbossilazione del radicale piperidinico, portando al derivato 5. Il grezzo di reazione dopo neutralizzazione è stato estratto con cloroformio e senza ulteriori purificazioni il derivato 5 è stato funzionalizzato con 4-cloro-fenilacetilcloruro in trietilamina, THF e DMF. Da tale reazione si è ottenuto il composto 6 dopo purificazione con flash cromatografia con una resa del 35%.

Il derivato 6 successivamente è stato ridotto nel corrispondente derivato amminico 7 per riduzione catalitica con Pd/C e H<sub>2</sub>. Dopo isolamento dal grezzo di reazione, il composto 7, è stato fatto reagire con NaN<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>Cl in DMF, nel reattore a microonde (CEM)

a 155° C per un'ora e mezza, portando al derivato tetrazolico **8** (resa 40%).

Parallelamente il composto **1** è stato sottoposto ad un processo di nitratura, al fine di ottenere l'intermedio **5a** come substrato facilmente sostituibile nella posizione 5 dell'anello piridinico. Tale reazione non ha portato a buoni risultati in quanto dopo diverse prove sono stati ottenuti dei grezzi di reazione difficilmente purificabili. Ad oggi tale iter sintetico è ancora in fase di ottimizzazione in quanto il prodotto desiderato **5a** è stato ottenuto in basse quantità, non sufficienti per ottenere (in ultima analisi) composti di tipo D.

## SCHEMA 2



**Reagenti e condizioni:** (i) ferrocianuro di potassio (II) triidrato, tetrakis (trifenilfosfina palladio(0)) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), miscela di *tert*-butanolo e acqua, sottovuoto e in atmosfera di azoto, dopo si mette in un bagno ad olio a 85° C per 12h; (ii) acido solforico concentrato e acido nitrico al 65%, l'aggiunta viene fatta in ghiaccio, dopo si lascia andare la reazione a temperatura ambiente per 12h e successivamente si scalda per 2h a 55° C; (iii) 4-cloro-fenilacetilcloruro, trietilammina, DMF e THF, temperatura ambiente per 12h; (iv) THF, ETOH assoluto e una punta di spatola di Pd/C, 12h; (v) sodio azide, cloruro d'ammonio, dimetilformamide, microonde, 150° C, 1,30h, 5 bar; (vi) acido solforico concentrato e acido nitrico al 65%, l'aggiunta viene fatta in ghiaccio, dopo si lascia andare la reazione a temperatura ambiente per 12h e successivamente si scalda per 2h a 55° C.

Per quanto riguarda derivati di sintesi di tipo E, l'1,4-dibromo-2-nitrobenzene è stato fatto reagire con l'etil-4-ammino-1-piperidincarbossilato in DMF, con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (s) e KI a 160° C (a riflusso), per ottenere il derivato **9** (*Schema 3*).

Tale composto è stato purificato attraverso flash cromatografia ottenendo il prodotto desiderato con una resa del 31%. Ulteriori processi di purificazione sono stati effettuati attraverso lavaggi di *n*-esano, ottenendo il prodotto puro in rese maggiori (45%) come una polvere marrone chiaro.

Successivamente il derivato **9** è stato idrolizzato in presenza di acido bromidrico (48%) a 110° C (a riflusso) dando il composto **10**. Il grezzo di reazione dopo neutralizzazione è stato sottoposto a trattamento con una soluzione di diclorometano e acetato di etile per ottenere il composto **10** puro (resa 82%).

Per ottenere il composto finale **11**, il derivato **10** è stato fatto reagire con il 4-cloro-fenilacetilcloruro in DMF, THF e ET<sub>3</sub>N. Tale reazione è stata condotta a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per una notte. Il prodotto desiderato **11** è stato isolato come polvere gialla per purificazione con flash cromatografia con rese del 51%.

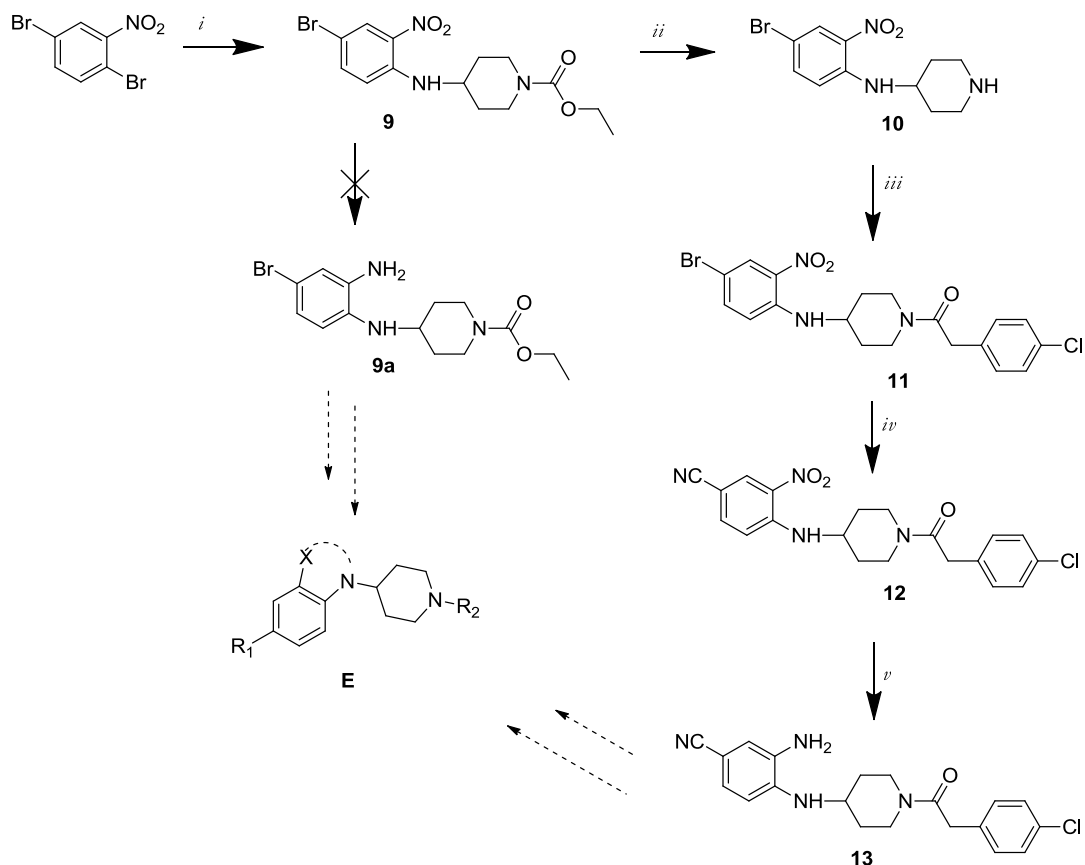
Per ottenere il ciano-derivato **12**, il precursore **11** è stato fatto reagire a 85° C in presenza di ferrocianuro di potassio (II) triidrato, tetrakis (trifenilfosfina palladio(0)) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene(DBU), in una soluzione di *tert*-butanolo e acqua. Il composto **12**, un solido marrone chiaro, è stato purificato attraverso flash cromatografia (resa 22%).

Il cianoderivato è stato convertito nel corrispondente derivato amminico **13** per trattamento con Pd/C e H<sub>2</sub>. Il composto è stato isolato con una resa 43%.

Anche il composto **9** è stato sottoposto ad un processo di riduzione. Purtroppo tale reazione non ha portato a buoni risultati in quanto dopo diverse prove sono stati ottenuti dei grezzi di reazione difficilmente purificabili. Ad oggi tale iter sintetico è ancora in fase

di ottimizzazione in quanto del prodotto desiderato 9a sono state ottenute basse quantità, non sufficienti per ottenere in ultima analisi composti di tipo E.

### SCHEMA 3



**Reagenti e condizioni :** (i) DMF, etil-4-ammino-1-piperidincarbossilato,  $Na_2CO_{3(s)}$ , KI, refluxo a 160° C, 20h; (ii) HBr 48%, refluxo, 110° C, 2h; (iii) 4-cloro-fenilacetilcloruro, THF, DMF,  $Et_3N$ , temperatura ambiente, 12h; (iv) ferrocianuro di potassio (II) triidrato, tetrakis (trifenilfosfina palladio(0)) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), miscela di terz-butanolo e acqua, sottovuoto e in atmosfera di azoto, si agita a temperatura ambiente per 10 minuti, dopo si mette in un bagno ad olio a 85° C per 12h; (v) THF, ETOH assoluto,  $H_2$  e una punta di spatola di PD/C, 12h, temperatura ambiente; (vi) THF, ETOH assoluto,  $H_2$  e una punta di spatola di PD/C, 12h, temperatura ambiente.

Il derivato **9** (*Schema 4*) è stato sottoposto a una reazione di cross coupling di Suzuki per ottenere tienil e p-fluorofenil derivati **14 a,b** per reazione con l'acido tiofen-2-boronic e l'acido 4-fluoro-benzenboronic, rispettivamente, in presenza di tetrakis (trifenilfosfina) palladio (0) e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq. I composti desiderati **14a** e **14b** sono stati ottenuti con buone rese (70 % e 68 % rispettivamente) per purificazione dei relativi grezzi di reazione attraverso flash-cromatografia. Seguendo l'iter sintetico descritto precedentemente i composti **14a** e **14b** sono stati sottoposti a reazione di idrolisi con acido bromidrico (48 %). I grezzi di reazione dopo neutralizzazione sono stati estratti con diclorometano per isolare i derivati **15a** e **15b** con rese (93 %, 90 %).

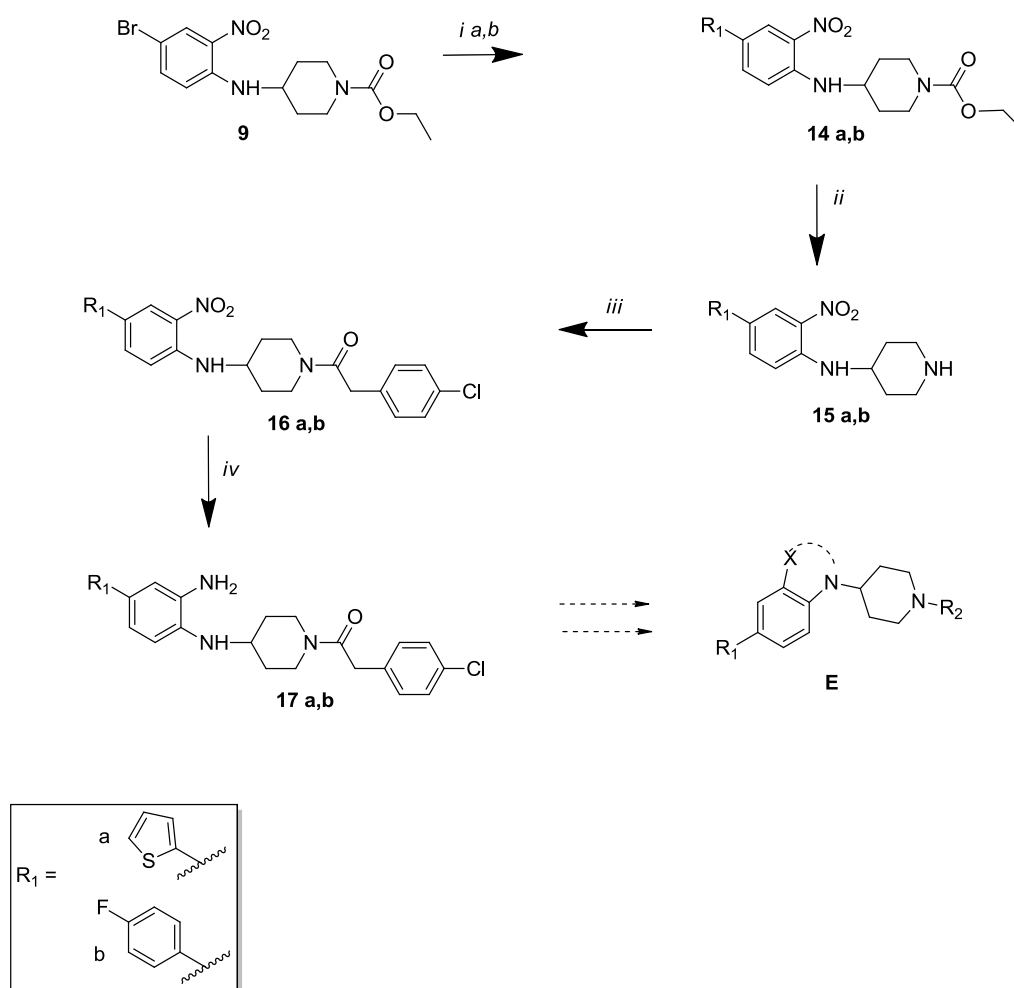
Successivamente questi composti sono stati funzionalizzati con il p-clorofenilacetilcloruro, in DMF, THF e ET<sub>3</sub>N. Tale reazione è stata condotta a temperatura ambiente, sotto agitazione magnetica per tutta la notte per ottenere i corrispondenti derivati **16a** e **16b**. Attraverso flash cromatografia sono stati isolati i composti desiderati con rese del 48 % (**16a**) e del 82% (**16b**).

Anche i composti **16a** e **16b** sono stati ridotti nei corrispondenti derivati amminici per riduzione con H<sub>2</sub> e di Pd/C e H<sub>2</sub> (**17 a,b**).

Il composto **17a** è stato isolato con rese del 54 % per purificazione con flash cromatografia, mentre il derivato **17b** è stato ottenuto in rese del 56 % per semplice estrazione dal grezzo di estrazione con etere etilico.



#### SCHEMA 4



**Reagenti e condizioni:** (i) 2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (aq), tetrakis, DMF, bagno ad olio a 125° C, tutta la notte; *a*: acido tiofen-2 boronico, *b*: acido 4-fluoro benzenboronico; (ii) HBr 48%, riflusso a 110° C per 2h; (iii) 4-cloro-fenilacetilcloruro, THF, DMF, ET<sub>3</sub>N, temperatura ambiente, 12h; (iv) THF, ETOH assoluto, H<sub>2</sub> e una punta di spatola di PD/C, 12h, temperatura ambiente.

Alcuni derivati ottenuti da questo lavoro di tesi saranno sottoposti a sperimentazione biologica per valutare la loro attività inibitoria verso SPT, inoltre tutti i derivati finali saranno sottoposti a ulteriori processi di reazione per ottenere derivati strutturalmente più complessi di formula generale D e E.

## **STRUMENTI**

La struttura di tutti i composti è stata confermata per mezzo della spettrometria di risonanza magnetica nucleare protonica ( $^1\text{H}$ -NMR).

Gli spettri sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker Avance III<sup>TM</sup> 400 (operante a 400 MHz) e sono riferiti al segnale residuo del solvente. I chemical shifts  $\delta$  sono espressi in ppm e le costanti di accoppiamento J sono espresse in Hz.

Le evaporazioni sono state eseguite sotto vuoto in evaporatore rotante.

Le TLC analitiche sono state eseguite usando lastre in gel di silice 60 F254 (MERCK) di spessore di 2 mm, contenenti un indicatore fluorescente; le varie macchie sono state valutate per mezzo di lampada UV (254 nm).

Per la cromatografia su colonna è stato usato gel di silice 60 (0,040-0,063 mm) (MERCK).

È stato utilizzato inoltre per alcune sintesi un reattore a microonde (CEM).

## **PARTE SPERIMENTALE**

### **terz-Butil 4-((5-bromopiridin-2-il)ammino)piperidina-1-carbossilato (1)**

Una quantità di 0.692 g (4 mmol) di 2-ammino-5-bromopiridina viene solubilizzata con 13 mL di diclorometano anidro e 1 mL di tetraidrofurano. Alla soluzione si aggiungono 686 µL di acido acetico (12 mmol,  $d = 1,05 \text{ g/mL}$ ) e 1,382 g (8 mmol) di 1-Boc-4-piperidone. In seguito, vengono aggiunti 2,119 g (10 mmol) di triacetossi-boroidruro di sodio e la miscela di reazione viene agitata a temperatura ambiente per 48 ore. La soluzione ottenuta, dopo neutralizzazione fino a  $\text{pH} \sim 7$  con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, viene estratta con diclorometano (3 x 50 mL). Gli estratti organici riuniti vengono anidrificati con solfato di sodio ed evaporati sotto vuoto. Il composto 1 si presenta come una polvere bianca e viene purificato mediante flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile, 3:2). Le frazioni riunite sono evaporate sotto vuoto.

Resa: 59%

Peso molecolare: 356,16;  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3\text{Br}$

Punto di fusione: 113-115° C

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.08 (s, 1H, Pir), 7.45 (d, 1H, Pir), 6.28 (d, 1H, Pir), 4.50 (s, 1H, NH), 4.04-3.69 (m, 4H), 2.93 (t, 1H), 2.44-1.91 (m, 4H), 1.45 (s, 9H, Boc)

## 5-bromo-N-(piperidin-4-il)piridin-2-ammina (2)

In un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,420 g di tert-butil 4-((5-bromopiridin-2-il)ammino)piperidina-1-carbossilato (**1**) (1,17 mmol) vengono sciolti in 11,7 mL di metanolo. Successivamente vengono aggiunti 1,92 mL (23,4 mmol) di acido cloridrico al 37%. La soluzione viene agitata a 25° C per 5h. Successivamente viene aggiunto del bicarbonato di sodio fino a pH ~ 8 e si agita. La soluzione così ottenuta viene prima concentrata sotto vuoto a piccolo volume e poi estratta con cloroformio. Gli estratti organici vengono riuniti e portati a secco sotto vuoto, si ottiene il così il composto desiderato.

Resa: 47%

Peso molecolare: 255,9; C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>Br

<sup>1</sup>H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 8.06 (s, 1H, Pir), 7.61 (d, 1H, Pir), 6.60 (d, 1H, Pir), 4.00 (s, 1H, NH), 3.32-3.301 (m, 4H), 2.62 (t, 1H), 2.08-1.63 (m, 4H)

### **1-(4-((5-bromopiridin-2-il)ammino)piperidi-1-il)-2-(4-clorofenil)etanone (3)**

In un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,142 g (0,55 mmol) di 5-bromo-N-(piperidin-4-il)piridin-2-ammina (5) vengono solubilizzati in 300  $\mu$ L di dimetilformammide e 2 mL di tetraidrofurano. La soluzione ottenuta è addizionata di 92  $\mu$ L (0.66 mmol, d= 0,727 g/mL) di trietilammina e 96  $\mu$ L (0.66 mmol, d= 1.292 g/mL) di p-cloro-fenilacetilcloruro. La reazione è agitata a temperatura ambiente per 20 ore, al termine viene concentrata a piccolo volume e trattata con ghiaccio per eliminare l'eccesso di DMF. Il grezzo di reazione filtrato, viene estratto con diclorometano (3 x 30 mL), seccato con solfato di magnesio e portato a secco. Il composto desiderato 3 si presenta come una polvere giallo scuro e viene isolato attraverso successivi lavaggi con etere etilico e n-esano.

Resa: 43%

Peso molecolare: 408,35; C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>1</sub>N<sub>3</sub>BrCl

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.01 (s, 1H, Pir), 7.52 (d, 1H, Pir), 7.23 (m, 2H, Ar), 7.19 (m, 2H, Ar), 6.32 (d, 1H, Pir), 4.40 (s, 1H, NH), 3.85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.39-3.29 (m, 4H), 2.63 (t, 1H), 2.08-1.56 (m, 4H)

#### **terz-Butil 4-((5-cianopiridin-2-il)ammino)piperidina-1-carbossilato (4)**

In una provetta da microonde da 2-5 mL contenente un magnete, sono caricati 0,200 g (0,56 mmol) di *terz*-Butil 4-(5-bromopiridin-2-ilammino)piperidina-1-carbossilato (1), 0,237 g (0,56 mmol) di ferrocianuro di potassio (II) triidrato e 0,032 g (0,028 mmol) di tetrakis (trifenilfosfina) di palladio (0). La provetta viene sigillata, viene fatto il vuoto tramite la pompa da vuoto e dopo viene insufflato azoto, si ripete la procedura per tre volte.

Successivamente, sotto azoto (si inserisce un ago per lo sfogo), sono aggiunti 3 mL di una soluzione di *tert*-butanolo/acqua (1:1) e 85  $\mu$ L (0,56 mmol,  $d = 1,018$  g/mL) di 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-ene (DBU). Infine viene tolto prima l'ago per lo sfogo e dopo quello dell'azoto. La fiala è agitata per 10 minuti a temperatura ambiente e in seguito a 85° C (in un bagno ad olio preriscaldato) per tutta la notte. La miscela di reazione viene filtrata con imbuto buchner e lavata con 20 mL di metanolo e 20 mL di diclorometano, poi si anidrifica con solfato di sodio e si evapora sotto vuoto. Il grezzo ottenuto, un semisolido scuro, viene purificato per flash cromatografia (etile acetato/etere di petrolio 1:1). Le frazioni raccolte sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come un solido giallo.

Resa: 75%

Peso molecolare: 302,37;  $C_{16}H_{21}O_2N_4$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.35 (s, 1H, Pir), 7.55 (d, 1H, Pir), 6.37 (d, 1H, Pir), 5.01 (s, 1H, NH), 4.12-3.36 (m, 4H), 2.96 (t, 1H), 2.04-1.96 (m, 4H), 1.46 (s, 9H, Boc)



## 5-nitro-6-(piperidin-4-ilammino)piridina-3-carbonitrile (5)

In un pallone munito di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,253 g di *ter*-Butil 4-((5-cianopiridin-2-il)ammino)piperidina-1-carbossilato (4) sono solubilizzati in 73  $\mu$ L di acido solforico concentrato. Il pallone è immerso in un bagno di ghiaccio e agitato per circa 30 minuti; vengono aggiunti successivamente 49  $\mu$ L di acido nitrico al 65 % e si lascia la reazione sotto agitazione per altre 2h.

Viene tolto il pallone dal ghiaccio e la reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte.

In seguito si mette il pallone in un bagno ad olio a 55° C per 2h.

La soluzione ottenuta viene neutralizzata dopo raffreddamento con idrossido di sodio al 50 %, viene controllato il pH con la cartina tornasole.

La fase acquosa è estratta con cloroformio (4 x 50 mL) e in seguito con acetato di etile (3 x 20 mL).

La fase organica viene anidrificata con solfato di sodio e portata a secco sotto vuoto.

Il grezzo viene utilizzato per la successiva fase di reazione.

Resa: 42%

Peso molecolare: 247,27;  $C_{11}H_{13}O_2N_5$

## **5-bromo-3-nitro-N-(piperidin-4-il)piridin-2-ammina (5a)**

In un pallone munito di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,365 g di *terz*-Butil 4-((5-bromopiridin-2-il)ammino)piperidina-1-carbossilato (1) sono solubilizzati in 860  $\mu$ L di acido solforico concentrato. Il pallone viene immerso in un bagno di ghiaccio e agitato per circa 30 minuti, si aggiungono in seguito 83  $\mu$ L di acido nitrico al 65 % e si lascia la reazione sotto agitazione per altre 2h. Viene tolto il pallone dal ghiaccio e la reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. In seguito si mette il pallone in un bagno ad olio a 55° C per 2h.

Dopo raffreddamento la soluzione ottenuta viene neutralizzata con idrossido di sodio al 50 %, controllo il pH con la cartina tornasole.

La fase acquosa è estratta con cloroformio (4 x 50 mL) e in seguito con acetato di etile (3 x 20 mL).

La fase organica viene anidrificata con solfato di sodio e portata a secco sotto vuoto. Il grezzo viene utilizzato per la successiva fase di reazione.

Resa: 88%

Peso molecolare: 301,14;  $C_{11}H_{13}O_2N_5$

**6-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)ammino)-5-nitropiridina-3-carbonitrile (6)**

In un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,106 g (0,43 mmol) di 5-nitro-6-(piperidin-4-ilammino)piridina-3-carbonitrile (8), vengono solubilizzati in 234  $\mu$ L di dimetilformammide e 1,6 mL di tetraidrofurano. La soluzione ottenuta è addizionata di 72  $\mu$ L (0.52 mmol, d= 0,727 g/mL) di trietilammina e 76  $\mu$ L (0.66 mmol, d= 1.292 g/mL) di p-cloro-fenilacetilcloruro. La reazione viene agitata a 35 °C per 20h. La soluzione ottenuta viene concentrata sotto vuoto e purificata tramite flash cromatografia (etile acetato/etere di petrolio 2:1), il campione prima di essere caricato in colonna viene solubilizzato in diclorometano. Le frazioni raccolte sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come un solido marrone scuro.

Resa: 35%

Peso molecolare: 399,64;  $C_{19}H_{21}O_3N_5Cl$

Punto di fusione: 113-115° C

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.02 (s, 1H, Pir), 7.31 (s, 1H, Pir), 7.28 (d, 2H, Ar), 7.22 (d, 2H, Ar), 3.72 (s, 1H, NH), 3.61 (s, 2H,  $CH_2$ ), 2.92 (m, 4H), 2.12 (m, 1H), 1.30-0.80 (m, 4H)

## **5-amino-6-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)amino)piridina-3-carbonitrile (7)**

In un pallone da 500 mL provvisto di magnete si sciolgono 0,058 g di 6-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)ammino)-5-nitropiridina-3-carbonitrile (9), in 4 mL di tetraidrofurano ed etanolo assoluto quanto basta alla solubilizzazione.

Si aggiunge una punta di spatola di palladio/carbone attivo e si attacca il pallone all'idrogenatore per 24 ore.

La soluzione ottenuta viene filtrata su celite con l'imbutto buchner e si lava con etanolo assoluto. Dopo la soluzione viene anidrificata e portata a secco sotto vuoto.

Si ottiene il composto puro oleoso, di colore giallo.

Resa: 83%

Peso molecolare: 369,45;  $C_{19}H_{20}ON_5Cl$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.02 (s, 1H, Pir), 7.35 (s, 1H, Pir), 7.32 (d, 2H, Ar), 7.22 (d, 2H, Ar), 6.57 (s, 2H,  $NH_2$ ), 4.41 (s, 1H, NH), 3.70 (m, 1H), 3.61 (s, 2H,  $CH_2$ ), 2.94 (m, 4H), 1.32-0.81 (m, 4H)

**1-(4-((3-ammino-5-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)ammino)piperidin-1-il)-  
2-(4-clorofenil)etanone (8)**

In una fiala da microonde da 0,5-2 mL, provvista di magnete, 46 mg (0,12 mmol) di 5-ammino-6-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)ammino)piridina-3-carbonitrile (7) vengono sciolti in 52  $\mu$ L di dimetilformammide anidra. Vengono aggiunti 23,4 mg (0,36 mmol) di sodio azide e 19,2 mg (0,36 mmol) di cloruro d'ammonio, si tappa la fiala e si mette al microonde per un'ora e mezzo a 150 °C e 5 bar di pressione.

In seguito si trasferisce il contenuto della fiala in un pallone, si aggiunge un'aliquota di etanolo assoluto e si porta a secco sotto vuoto.

Successivamente si tritura in etere etilico e in tetraidrofurano per eliminare il prodotto di partenza e altri prodotti indesiderati; si ottiene così il prodotto pulito, che si presenta come una polvere marrone.

Resa: 40%

Peso molecolare: 412,45;  $C_{19}H_{21}ON_8Cl$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.97 (s, 1H, Pir), 7.50 (s, 1H, Pir), 7.41 (d, 2H, Ar), 7.37 (d, 2H, Ar), 6.57 (s, 2H,  $NH_2$ ), 4.41 (s, 1H, NH), 3.85 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3.29 (m, 4H), 2.63 (m, 1H), 1.81-1.56 (m, 4H)

## **Etil 4-(4-bromo-2-nitrofenilammino)piperidina-1-carbossilato (9)**

0,842 g (3 mmol) di 1,4-dibromo-2-nitrobenzene vengono sciolti in 10 mL di dimetilformammide, in un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio. Alla soluzione ottenuta si aggiungono di 514  $\mu$ L (3 mmol,  $d = 1,004$  g/mL) di etil-4-aminopiperidine-1-carbossilato, 0,318 g (3 mmol) di carbonato di sodio e 0,050 g (0,3 mmoli) di ioduro di potassio. La soluzione viene riscaldata a  $160^\circ\text{C}$  (a riflusso) per 20h. Successivamente, viene concentrata sotto vuoto con il rotavapor. Il prodotto ottenuto è solubilizzato in acetato di etile e lavato con acido cloridrico 0,5 M (3 x 25 mL). L'estratto organico viene anidrificato con solfato di sodio ed evaporato sotto vuoto. Il solido grezzo nero è purificato con dei lavaggi di n-esano. Un processo di purificazione alternativo consiste nella flash cromatografia utilizzando come miscela eluente toluene/etere di petrolio (10:1) e successivamente acetato di etile.

Si ottiene il prodotto puro che si presenta come polvere marrone.

Resa: 31%

Peso molecolare: 372,04;  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}$

Punto di fusione:  $108-110^\circ\text{C}$

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.33 (s, 1H, Ar), 8.06 (s, 1H, NH), 7.50 (d, 1H, Ar), 6.79 (d, 1H, Ar), 4.19-4.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.67-3.62 (m, 1H), 3.10 (t, 2H), 2.07-2.04 (m, 2H), 1.61-1.51 (m, 4H), 1.32 (t, 3H)

## **Etil 4-((2-amino-4-bromofenil)amino)piperidina-1-carbossilato (9a)**

In un pallone da 500 mL provvisto di magnete si sciolgono 0,209 g di 6-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)ammino)-5-nitropiridina-3-carbonitrile (9), in 15 mL di tetraidrofurano ed etanolo assoluto quanto basta alla solubilizzazione.

Si aggiunge una punta di spatola di palladio/carbone attivo e si attacca il pallone all'idrogenatore per 24 ore.

La soluzione ottenuta viene filtrata su celite con l'imbuto buchner e si lava con acetato di etile. Successivamente la soluzione viene anidrificata e portata a secco sotto vuoto. Si ottiene un composto liquido oleoso giallo.

Resa: 40%

Peso molecolare: 342,04;  $C_{19}H_{20}ON_5Cl$

## **N-(4-bromo-2-nitrofenil)piperidin-4-ammina (10)**

In un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio, 114 mg (0,31 mmol) di etil-4-(4-bromo-2-nitrofenilammino)piperidina-1-carbossilato vengono solubilizzati in 0.5 mL di acido bromidrico (48%).

La soluzione è riscaldata a riflusso a 110° C per 2h.

Il solvente viene rimosso sotto vuoto e successivamente il grezzo viene neutralizzato con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, si controlla il pH con la cartina tornasole.

Si estrae il prodotto prima con diclorometano e dopo con acetato di etile; gli estratti organici si uniscono, vengono anidrificati e portati a secco sotto vuoto.

Il grezzo viene utilizzato per la successiva fase di reazione.

Resa: 82%

Peso molecolare: 300,09;  $C_{14}H_{14}N_3O_2Br$



**1-(4-((4-bromo-2-nitrofenil)amino)piperidin-1-il)-2-(4-clorofenil)etanone (11)**

0,124 g (0,55 mmol) di N-(4-bromo-2-nitrofenil)piperidin-4-ammina (2) vengono sciolti in 4 mL di dimetilformammide e 2 mL di tetraidrofurano, in un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio. Si aggiungono alla soluzione 170  $\mu$ L di trietilammia (1,23 mmol, d= 0,727 g/mL) e 71  $\mu$ L (0,49 mmol, d= 1.292 g/mL) di 4-clorofenilacetilcloruro.

La reazione è condotta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. Al termine la soluzione viene concentrata a piccolo volume e trattata con ghiaccio per eliminare l'eccesso di DMF. La fase acquosa è estratta con cloroformio (3 x 20 mL), l'estratto organico viene essiccato con solfato di magnesio e portato a secco sotto vuoto. Il grezzo di reazione viene purificato mediante flash cromatografia. Si utilizza come miscela eluente, acetato di etile/etere di petrolio (2:1). Le frazioni riunite sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come una polvere arancione.

Resa: 56%

Peso molecolare: 452.45; C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>BrCl

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.33 (s, 1H, Ar), 8.04 (s, 1H, NH), 7.49 (d, 1H, Ar), 6.75 (d, 1H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar), 7.19 (m, 2H, Ar), 4.40-4.37 (m, 1H), 8.85-8.81 (d, 2H), 3.73 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.18(t, 2H), 2.10-1.98 (m, 2H), 1.41-1.39 (m, 2H)

## **4-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)amino)-3-nitrobenzonitrile (12)**

In una provetta da microonde da 2-5 mL, contenente un magnete, sono caricati 0,100 g (0,22 mmol) di prodotto puro 1-(4-((4-bromo-2-nitrofenil)amino)piperidin-1-il)-2-(4-clorofenil)etanone (3), 0,111 g (0,26 mmol) di ferrocianuro di potassio (II) triidrato e 0,127 g (0,011 mmol) di tetrakis (trifenilfosfina) di palladio (0). La provetta viene sigillata, viene fatto il vuoto tramite la pompa da vuoto e dopo si insuffla azoto; si ripete l'operazione per tre volte.

Successivamente sotto azoto (si inserisce un ago per lo sfogo) si aggiunge 1 mL di una soluzione di tert-butanolo/acqua (1:1) e 40  $\mu$ L (0,26 mmol,  $d = 1,018$  g/mL) di 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-ene (DBU). La fiala è agitata per 10 minuti a temperatura ambiente e in seguito a 85° C (in un bagno ad olio preriscaldato) per tutta la notte. La miscela di reazione viene filtrata con imbuto buchner e lavata con 20 ml di metanolo e 20 ml di diclorometano, poi viene anidrificata con solfato di sodio ed evaporata sotto vuoto. Il grezzo ottenuto, un semisolido scuro, è purificato con flash cromatografia (etile acetato/etere di petrolio 2:1). Le frazioni raccolte sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come un solido marrone chiaro.

Resa: 22%

Peso molecolare: 398,45;  $C_{20}H_{19}N_4O_3Cl$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.53 (s, 1H, Ar), 8.39 (s, 1H, NH), 7.60 (d, 1H, Ar), 7.32 (m, 2H, Ar) 7.22 (m, 2H, Ar), 6.9 (d, 1H, Ar), 4.46-4.25 (m, 1H), 3.73 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.17 (t, 2H), 2.33-1.98 (m, 2H), 1.41-1.39 (m, 2H)

### **3-amino-4-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)amino)benzonitrile (13)**

In un pallone da 500 mL provvisto di magnete si sciolgono 0,030 g (0,07 mmol) di 4-((1-(2-(4-clorofenil)acetil)piperidin-4-il)amino)-3-nitrobenzonitrile (12), in 3 mL di tetraidrofurano ed etanolo assoluto quanto basta alla solubilizzazione.

Si aggiunge una punta di spatola di palladio/carbone attivo e si attacca il pallone all'idrogenatore per 24 ore.

La soluzione ottenuta viene filtrata su celite con l'imbuto buchner e si lava con etanolo assoluto. Dopo la soluzione viene anidrificata e portata a secco sotto vuoto.

Il composto viene sottoposto a dei lavaggi con acetato di etile e successivamente con toluene, ottenendo così il prodotto puro che si presenta come un liquido oleoso nero.

Resa: 43%

Peso molecolare: 368,45;  $C_{20}H_{21}N_4OCl$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.00 (s, 1H, Ar), 7.60 (d, 1H, Ar), 7.50 (m, 2H, Ar), 7.41 (m, 2H, Ar), 7.30 (m, 2H, Ar), 6.27 (s, 2H, NH), 4.30 (s, 1H, NH), 4.46-4.25 (m, 1H), 3.85 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3.17 (t, 2H), 2.33-1.98 (m, 2H), 1.51-1.40 (m, 2H)

## **Etil 4-((2-nitro-4-(tiofen-2-il)fenil)amino)piperidina-1-carbossilato (14 a)**

In una fiala da 10-20 mL, provvista di magnete si solubilizzano 0,200 g (0,54 mmol) di etil 4-(4-bromo-2-nitrofenilammino)piperidina-1-carbossilato (9) in 4,38 mL di dimetilformammide. Si aggiungono 0,031 g (0,027 mmol) di tetrakis (trifenilfosfina) palladio (0), 0,075 g (0,59 mmol) di acido tienil-boronic e 1,22 mL (2,43 mmol) di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq 2M. Si tappa la fiala e si mette in un bagno ad olio preriscaldato a 125° C per tutta la notte. Alla soluzione ottenuta si aggiunge acqua (3x50 mL), il grezzo di reazione è poi estratto con acetato di etile (4x30 mL) e la fase organica viene anidrificata con solfato di sodio e portata a secco sotto vuoto.

Il prodotto viene purificato attraverso flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 2:1), le frazioni raccolte sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come un liquido oleoso di colore arancione scuro.

Resa: 70 %

Peso molecolare: 375,14; C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.38 (s, 1H, Ar), 8.13 (s, 1H, NH), 7.66 (d, 1H, Ar), 7.21 (d, 2H Tiofene), 7.04 (t, 1H, Tiofene), 6.89 (d, 1H, Ar), 4.17-4.09 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.74-3.68 (m, 1H), 3.11 (t, 2H), 2.15-2.03 (m, 2H), 1.63-1.48 (m, 4H), 1.24 (t, 3H)

## **N-(2-nitro-4-(tiofen-2-il)fenil)piperidin-4-amina (15 a)**

In un pallone provvisto di magneti e tappo al cloruro di calcio, 0,100 g (0,27 mmol) di etil 4-((2-nitro-4-(tiofen-2-il)fenil)amino)piperidina-1-carbossilato (14 a) vengono solubilizzati in 0,40 mL di acido bromidrico (48%).

La soluzione è riscaldata a riflusso a 110° C per 2h.

Il solvente viene rimosso sotto vuoto e il grezzo viene neutralizzato con una soluzione satura di bicarbonato di sodio; si controlla il pH con la cartina tornasole.

Si estrae il prodotto con diclorometano, la fase organica viene anidrificata con solfato di sodio e portata a secco sotto vuoto. Il grezzo viene utilizzato per la successiva fase di reazione.

Resa: 93%

Peso molecolare: 303;  $C_{15}H_{17}N_3O_2S$

**2-(4-clorofenil)-1-(4-((2-nitro-4-(tiofen-2-il)fenil)amino)piperidin-1-il)etanone      (16 a)**

In un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,076 g (0,25 mmol) di N-(2-nitro-4-(tiofen-2-il)fenil)piperidin-4-amina (15 a) vengono sciolti in 2,5 mL di dimetilformammide e 1,5 mL di tetraidrofurano. Si aggiungono alla soluzione 104  $\mu$ L di trietilammina (0,75 mmol, d= 0,727 g/mL) e 43  $\mu$ L (0,3 mmol, d= 1.292 g/mL) di 4-cloro-fenilacetilcloruro.

La reazione è condotta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. Al termine la soluzione viene concentrata a piccolo volume e trattata con ghiaccio per eliminare l'eccesso di DMF.

La fase acquosa è estratta con cloroformio (3 x 20 mL). La fase organica viene essiccata con solfato di magnesio e portata a secco sotto vuoto. Il grezzo di reazione viene purificato con flash cromatografia. Si utilizza come miscela eluente acetato di etile/etere di petrolio (1:1). Le frazioni riunite sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come un liquido oleoso rossastro.

Resa: 48%

Peso molecolare: 455,45; C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SCl

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.41 (s, 1H, Ar), 8.10 (s, 1H, NH), 7.67 (d, 1H, Ar), 7.31 (m, 1H, Ar), 7.22 (d, 2 H Tiofene), 7.18 (m, 1H, Ar), 7.05 (t, 1H, Tiofene), 6.86 (d, 1H, Ar), 4.38-4.45 (m, 1H), 3.84-3.83 (m, 1H), 3.81-3.80 (m, 1H), 3.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.26 (t, 1H), 3.11 (t, 1H), 2.12-2.11 (m, 2H), 2.00-1.99 (m, 2H)

**1-(4-((2-amino-4-(tiofen-2-il)fenil)amino)piperidin-1-il)-2-(4-clorofenil)etanone (17 a)**

In un pallone da 500 mL provvisto di magnete, vengono sciolti 0,040 g (0.09 mmol) di 2-(4-clorofenil)-1-(4-((2-nitro-4-(tiofen-2-il)fenil)amino)piperidin-1-il)etanone (16 a) in 3 mL di tetraidrofurano ed etanolo assoluto quanto basta alla solubilizzazione.

Si aggiunge una punta di spatola di palladio/carbone attivo e si attacca il pallone all'idrogenatore per 24 ore.

La soluzione ottenuta viene filtrata su celite con l'imbuto buchner e si lava con etanolo assoluto. Dopo la soluzione viene anidrificata e portata a secco sotto vuoto.

Il prodotto viene purificato tramite flash-cromatografia utilizzando come miscela eluente prima acetato di etile/etere di petrolio (2:1), successivamente acetato di etile/metanolo (8:2).

Si ottiene così il prodotto finale puro, di colore giallo chiaro, che si presenta come un liquido oleoso.

Resa: 56%

Peso molecolare: 425,45;  $C_{23}H_{24}N_3OSCl$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.90 (s, 1H, Ar), 8.11 (s, 2H, NH), 7.45 (d, 1H, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 7.29 (d, 2H Tiofene), 7.26 (m, 2H, Ar), 7.09 (t, 1H, Tiofene), 7.04 (d, 2H, Ar), 4.92 (s, 1H, NH), 4.94-4.07 (m, 4H), 3.81 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3.18 (m, 1H), 3.11 (t, 1H), 2.66 (m, 1H), 2.30-1.98 (m, 2H)

## **Etil 4-((4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-bifenil]-4-il)amino)piperidina-1- carbossilato (14 b)**

In una fiala da 10-20 mL, provvista di magnete si solubilizzano 0,200 g (0,54 mmol) di etil 4-(4-bromo-2-nitrofenilammino)piperidina-1-carbossilato (9) in 4,38 mL di dimetilformammide. Si aggiungono 0,031 g (0,027 mmol) di tetrakis (trifenilfosfina) palladio (0), 0,083 g (0,59 mmol) di acido 4-fluoro-benzen-boronic e 1,22 mL (2,43 mmol) di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aq 2M. Si tappa la fiala e si mette in un bagno ad olio preriscaldato a 125° C per tutta la notte. Alla soluzione ottenuta viene aggiunta acqua (3x50 mL), il grezzo di reazione è estratto con acetato di etile (4 x 30 mL) e la fase organica viene anidrificata con solfato di sodio e portata a secco sotto vuoto.

Il prodotto viene purificato attraverso flash cromatografia (etere di petrolio/acetato di etile 2:1), le frazioni raccolte sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come un liquido oleoso di colore arancione scuro.

Resa: 68 %

Peso molecolare: 387,16;  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{F}$

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.35 (s, 1H, Ar), 8.11 (s, 1H, Ar), 7.49 (m, 2H, Ar), 7.46 (m, 2H, Ar), 6.94 (s, 1H, Ar), 4.16 (s, 1H, NH), 4.13-4.07 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.67-3.69 (m, 1H), 3.11 (t, 2H), 2.10-2.07 (m, 2H), 1.63-1.53 (m, 4H), 1.30 (t, 3H)



## **N-(4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-bifenil]-4-il)piperidin-4-amina (15 b)**

In un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,100 g (0,26 mmol) di etil 4-((4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-bifenil]-4-il)amino)piperidina-1-carbossilato (14 b) vengono solubilizzati in 0,39 mL di acido bromidrico (48%).

La soluzione è riscaldata a riflusso a 110° C per 2h.

Il solvente viene rimosso sotto vuoto e il grezzo viene neutralizzato con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, si controlla il pH con la cartina tornasole. Si estrae il prodotto con diclorometano, la fase organica viene anidrificata con solfato di sodio e portata a secco sotto vuoto. Il grezzo viene utilizzato per la successiva fase di reazione.

Resa: 90 %

Peso molecolare: 315,14;  $C_{17}H_{18}N_3O_2F$

**2-(4-clorofenil)-1-(4-((4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-bifenil]-4-il)amino)piperidin-1-il)etanone (16 b)**

In un pallone provvisto di magnete e tappo al cloruro di calcio, 0,084 g (0,26 mmol) di N-(4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-bifenil]-4-il)piperidin-4-amina (15 b) vengono sciolti in 2,6 mL di dimetilformammide e 1,56 mL di tetraidrofurano. Si aggiungono alla soluzione 108 µL di trietilammina (0,78 mmol, d= 0,727 g/mL) e 45 µL (0,3 mmol, d= 1.292 g/mL) di 4-cloro-fenilacetilcloruro.

La reazione è condotta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte.

La miscela di reazione è concentrata sotto vuoto e trattata con ghiaccio per eliminare la dimetilformammide rimasta. La fase acquosa è estratta con cloroformio (3 x 20 mL). L'estratto organico viene essiccato con solfato di magnesio e portato a secco sotto vuoto. Il composto viene purificato attraverso flash cromatografia, si utilizza come miscela eluente acetato di etile/etere di petrolio (2:1). Le frazioni riunite sono evaporate e portano al prodotto puro che si presenta come un liquido oleoso rosso scuro.

Resa: 82%

Peso molecolare: 467,45;  $C_{25}H_{23}N_3O_3FCl$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.37 (s, 1H, Ar), 8.08 (s, 1H, Ar), 7.51 (m, 2H, Ar), 7.48 (m, 2H, Ar), 7.22 (m, 2H, Ar), 7.20 (m, 2H, Ar), 6.92 (s, 1H, Ar), 4.40 (s, 1H, NH), 3.74 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3.30-3.01 (m, 4H), 2.15 (t, 1H), 1.97-1.39 (m, 4H)

**1-(4-((3-amino-4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)amino)piperidin-1-il)-2-(4-clorofenil)etanone (17 b)**

In un pallone da 500 mL provvisto di magnete si sciolgono 0,060 g (0,13 mmol) di 2-(4-clorofenil)-1-(4-((4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-bifenil]-4-il)amino)piperidin-1-il)etanone (16 b), in 4,3 mL di tetraidrofurano ed etanolo assoluto quanto basta alla solubilizzazione.

Si aggiunge una punta di spatola di palladio/carbone attivo e si attacca il pallone all'idrogenatore per 24 ore.

La soluzione ottenuta viene filtrata su celite con l'imbuto buchner e si lava con etanolo assoluto. Dopo la soluzione viene anidrificata e portata a secco sotto vuoto.

Il composto viene sottoposto a dei lavaggi con etere etilico ottenendo così il prodotto puro che si presenta come liquido oleoso giallo.

Resa: 54%

Peso molecolare: 437,45;  $C_{25}H_{25}N_3OFCI$

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.94 (s, 2H, NH), 7.90 (s, 1H, Ar), 7.45 (d, 1H, Ar), 7.38 (m, 1H, Ar), 7.29 (d, 2H Tiofene), 7.26 (m, 2H, Ar), 7.09 (t, 1H, Tiofene), 7.04 (d, 2H, Ar), 4.92 (s, 1H, NH), 4.94-4.07 (m, 4H), 4.56 (s, 2H,  $CH_2$ ), 3.18 (m, 1H), 3.11 (t, 1H), 2.66 (m, 1H), 2.30-1.98 (m, 2H)

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Hanada K.; Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism; *Biochim Biophys Acta*; 2003 Jun 10; 1632(1-3); 16-30.
2. Yard BA, Carter LG, Johnson KA *et al.*; *J Mol Biol.*; 2007 Jul 27; 370(5); 870-86.
3. Spiegel S, Merrill AH Jr; Sphingolipid metabolism and cell growth regulation; *FASEB J.*; 1996 Oct; 10(12); 1388-97.
4. Lowther J, Naismith JH, Dunn TM *et al.*; Structural, mechanistic and regulatory studies of serine palmitoyltransferase; *Biochem Soc Trans.*; 2012 Jun 1; 40(3); 547-54.
5. Braun PE, Snell EE.; Keto intermediates in synthesis of sphingosine and dihydrosphingosine by cell-free extracts of *Hansenula ciferri*; *J Biol Chem.*; 1968 Jul 25; 243(14); 3775–3783;
6. Stoffel W, LeKim D, Sticht G; Biosynthesis of dihydrosphingosine in vitro; *Physiol Chem.*; 1968 May; 349(5); 664-70.
7. J .N. Kanfe; Sphingolipid metabolism: J.N. Kanfer, S. Hakomori (Eds.), *Sphingolipid Biochemistry*, Plenum, New York, NY, USA; 1983; pp. 167–247.
8. Yard BA, Carter LG, Johnson KA *et al.*; The structure of serine palmitoyltransferase: gateway to sphingolipid biosynthesis; *J. Mol. Biol.*; 2007 Jul 27; 370(5); 870-86.
9. Ikushiro H, Hayashi H, Kagamiyama H; A water-soluble homodimeric serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T strain. Purification, characterization, cloning, and overproduction; *J Biol Chem.*; 2001 May 25; 276(21); 18249-56.
10. Ikushiro H, Islam MM, Okamoto A.; Structural insights into the enzymatic mechanism of serine palmitoyltransferase from *Sphingobacterium multivorum*; *J Biochem.*; 2009 Oct; 146(4); 549-62.
11. Weiss B, Stoffel W.; Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase-cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis; *Eur. J. Biochem.*; 1997 Oct 1; 249 (1); 239-47.
12. Hanada K, Hara T, Nishijima M, *et al.*; A mammalian homolog of the yeast LCB1 encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis; *J. Biol. Chem.*; 1997 Dec 19; 272(51); 32108-14.
13. Ikushiro H, Hayashi H, Kagamiyama H.; Bacterial serine palmitoyltransferase: a water-soluble homodimeric prototype of the eukaryotic enzyme; *Biochemistry*; 2002 July 14.
14. Merrill AH.; Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. *Chemical Reviews*; 2011; 111(10); 6387-6422.

15. Hanada K, Hara T, *et al.*; Mammalian cell mutants resistant to a sphingomyelin-directed cytolysin: Genetic and biochemical evidence for complex formation of the LCB1 protein with the LCB2 protein for serine palmitoyltransferase; *J. Biol. Chem.*; 1998; 273(50); 33787-33794
16. Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B *et al.*; Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis; *Nature*; 2010 Feb 25; 463(7284); 1048-53.
17. Han G, Gupta SD, Gable K, Niranjanakumari S *et al.*; Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 2009 May 19; 106(20); 8186-91.
18. Hanada K, Hara T, Nishijima M.; Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques; *J Biol Chem.*; 2000 Mar 24; 275(12); 8409-15.
19. Ikushiro H, Hayashi H, Kagamiyama H; Reactions of serine palmitoyltransferase with serine and molecular mechanisms of the actions of serine derivatives as inhibitors; *Biochemistry*; 2004, 43(4); 1082-1092.
20. Zweerink MM, Edison AM, Wells GB, *et al.*; Characterization of a novel, potent, and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase; *J Biol Chem.*; 1992 Dec 15; 267(35); 25032-8;
21. Mandala SM, Thornton RA, Frommer BR, Dreikorn S, Kurtz MB.; Viridofungins, novel inhibitors of sphingolipid synthesis, *The Journal of Antibiotics*; 1997; 50(4); 339-343
22. Jonathan Lowther, Ashley E. Beattie, Pat R. R. Langridge-Smith *et al.*; L-Penicillamine is a mechanism-based inhibitor of serine palmitoyltransferase by forming a pyridoxal-50-phosphate-thiazolidine adduct; *Med. Chem. Commun.*; 2012; 3; 1003
23. Lowther J, Yard BA, Johnson KA, Carter LG *et al.*; Inhibition of the PLP-dependent enzyme serine palmitoyltransferase by cycloserine: evidence for a novel decarboxylative mechanism of inactivation; *Mol Biosyst.*; 2010 Sep; 6(9); 1682-93.
24. Neuhaus FC, Lynch JI.; The enzymatic synthesis of d-alanyl-d-alanine. On the inhibition of d-alanyl-d-alanine synthetase by the antibiotic d-cycloserine; *Biochemistry.*; 1964 Apr; 3; 471-80.
25. Wadsworth JM, Clarke DJ, McMahon SA, Lowther JP *et al.*; The Chemical Basis of Serine Palmitoyltransferase Inhibition by Myriocin; *J Am Chem Soc.*; 2013 Sep 11.

26. Strettoi E, Gargini C, Novelli E, *et al.*; Inhibition of ceramide biosynthesis preserves photoreceptor structure and function in a mouse model of retinitis pigmentosa; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 26;107(43):18706-11.
27. Ávila-Fernández A, Cantalapiedra D, Aller E, *et al.*; Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray; *Molecular Vision* 2010; 16:2550-2558.
28. Corrochano S, Barhoum R, Boya P. *et al.*; Attenuation of vision loss and delay in apoptosis of photoreceptors induced by proinsulin in a mouse model of retinitis pigmentosa; *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 2008 Sep; 49(9); 4188-94.
29. Tuson M, Marfany G, González-Duarte R.; Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26); *Am J Hum Genet.*; 2004 Jan; 74(1); 128-38.
30. Acharya U, Patel S, Koundakjian E, *et al.*; Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration; *Science.*; 2003 Mar 14;299(5613); 1740-3.
31. Sanvicens N, Cotter TG.; Ceramide is the key mediator of oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells; *J Neurochem.*; 2006 Sep; 98(5); 1432-44.
32. Chang B, Hawes NL, Pardue MT *et al.*; Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene; *Vision Res.*; 2007 Mar; 47(5); 624-33
33. Barhoum R, Martínez-Navarrete G, Corrochano S, Germain F *et al.*; Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse; *Neuroscience.*; 2008 Aug 26;155(3); 698-713.
34. Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Kahn, S., *et al.* Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE; *Science*; 1999; 286:735-741.
35. Arnold, S.E., Hyman, B.T., Flory, J., Damasio, A.R *et al.*; The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease; *Cereb. Cortex*, 1991, 1:103-116.
36. Braak, H., and Braak, E.; Pathology of Alzheimer's disease; *Neurodegenerative Diseases.*; Saunders, Philadelphia; 1994; pp. 585-614.
37. Burger's medicinal chemistry, 6th edition.
38. Goodman&Gilman, pharmacological bases of therapy, 11th edition.

39. Furuya S, Mitoma J, Makino A, *et al.*; Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells; *J Neurochem.*; 1998 Jul;71(1); 366-77.
40. Irie F, Hirabayashi Y.; Application of exogenous ceramide to cultured rat spinal motoneurons promotes survival or death by regulation of apoptosis depending on its concentrations; *J Neurosci Res.*; 1998 Nov 15; 54(4); 475-85.
41. Brugg B, Michel PP, Agid Y, *et al.*; Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons; *J Neurochem.*; 1996 Feb;66(2):733-9.
42. Sato H, Tomimoto H, Ohtani R, *et al.*; Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis; *Neuroscience.*; 2005; 130(3); 657-66.
43. Sastry PS, Rao KS; Apoptosis and the nervous system; *J Neurochem.* 2000 Jan; 74(1); 1-20.
44. Kalvodova L, Kahya N, Schwille P *et al.*; Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro; *J Biol Chem.*; 2005 Nov 4; 280(44); 36815-23.
45. Julien C, Tremblay C, Phivilay A.; High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model; *Neurobiol Aging.*; 2010 Sep; 31(9); 1516-31.
46. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson M P.; Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease; *Neurobiol Aging.*; 1997 Sep-Oct; 18(5); 457-61.
47. Mattson MP.; Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity; *Trends Neurosci.*; 1998 Feb; 21(2); 53-7.
48. Roy G, Cutler, Jeremiah Kelly, Kristin Storie, *et al.*; Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease; *PNAS*; February 17, 2004; vol. 101; no. 7; 2070–2075.
49. Haughey NJ, Bandaru VV, Bae M, *et al.*; Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis; *Biochim Biophys Acta.*; 2010 Aug; 1801(8); 878-86.
50. Hur JY, Welander H, Behbahani H, *et al.*; Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain; *FEBS J*; 2008 Mar;275(6):1174-87.
51. Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, *et al.*; Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes; *J Biol Chem.*; 2004 Oct 22;279(43):44945-54.



52. Sundaram KS, Lev M.; The long-term administration of L-cycloserine to mice: specific reduction of cerebroside level; *Neurochem Res*; 1989 Mar; 14(3); 245-8.
53. Janus C, Phinney AL, Chishti MA *et al.*; New developments in animal models of Alzheimer's disease; *Curr Neurol Neurosci Rep.*; 2001 Sep; 1(5); 451-7.
54. Auer-Grumbach M.; Hereditary sensory neuropathy type I; *Orphanet J Rare Dis.*; 2008 Mar 18; 3; 7.
55. Hereditary sensory neuropathy type 1 - Genetics Home reference; U.S. National Library of Medicine.
56. Bi H, Gao Y, Yao S, Dong M *et al.*; Hereditary sensory and autonomic neuropathy type I in a Chinese family: British C133W mutation exists in the Chinese; *Neuropathology*; 2007 Oct; 27(5); 429-33.
57. Klein CJ, Wu Y, Kruckeberg KE *et al.*; SPTLC1 and RAB7 mutation analysis in dominantly inherited and idiopathic sensory neuropathies; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 2005 Jul; 76(7); 1022-4.
58. Houlden H, King R, Blake J; Pathological and genetic characterization of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSAN I); *Brain*; 2006 Feb; 129 (Pt 2); 411-25.
59. Hornemann T, Penno A, Richard S *et al.*; A systematic comparison of all mutations in hereditary sensory neuropathy type I (HSAN I) reveals that the G387A mutation is not disease associated; *Neurogenetics*; 2009 Apr; 10(2):135-43.
60. Penno A, M. Reilly M, Houlden H *et al.*; Hereditary Sensory Neuropathy Type 1 Is Caused by the Accumulation of Two Neurotoxic Sphingolipids; *J Biol Chem.*; 2010 Jan 22; 285; 11178-11187.
61. E. Beattie A, D. Gupta S, Frankova L *et al.*; The Pyridoxal 5-Phosphate (PLP)-Dependent Enzyme Serine Palmitoyltransferase (SPT): Effects of the Small Subunits and Insights from Bacterial Mimics of Human hLCB2a HSAN1 Mutations, *BioMed Research International*; 2013 July; 194371.
62. Lebowitz HE, Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001; 109 (Suppl 2): S135-S148.
63. Watson ML, Coghlan M, Hundal HS; Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Biochem J*; 2009; 417; 791-801.
64. Mikłosz A, Łukaszuk B, Baranowski M, Górski J, Chabowski A; Effects of Inhibition of Serine Palmitoyltransferase (SPT) and Sphingosine Kinase 1 (SphK1) on

Palmitate Induced Insulin Resistance in L6 Myotubes. *PLOS ONE*, December 2013; Volume 8, Issue 12.

65. Bolton, Hutchings, Kohrt, Park, Van Huis, 2007, Inhibitors of serine palmitoyltransferase; 17 lug 2007; (WO 2008084300 A1).
66. Ahmed F. Abdel-Magid, Kenneth G. Carson, Bruce D. Harris, Cynthia A. Maryanoff, and Rekha D. Shah. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures; *J. Org. Chem.*; 1996, 61, 3849 3862.
67. Dengyou Zhang, Haifeng Sun, Lei Zhang *et al.* An expedient Pd/DBU mediated cyanation of aryl/heteroaryl bromides with K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]; *Chem. Commun.*; 2012; 48; 2909–2911.